UNIVERSITE PARIS-SUD

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Année : 1971 - 1972

Série E. N° 258

THESE

Présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Pour l'obtension du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Jeanne-Marie FEGER

Titre de la thèse :

PURIFICATION ET DESCRIPTION D'UNE GLYCOPROTEINE SERIQUE

ETUDE DE SON MODE D'ACTION PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE EN PRESENCE D'HISTAMINE

Soutenue le 5 juillet 1972

JURY :

Président

M. J.E. COURTOIS

Examinateurs

MM. Y. COHEN, J. AGNERAY, J.C. SCHWARTZ

COPEDITH - 70, rue de Flandre - 75 PARIS XIXe

UNIVERSITE PARIS-SUD

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Année : 1971 - 1972

Série E. N° 258

THESE

Présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Pour l'obtension du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Jeanne-Marie FEGER

Titre de la thèse :

PURIFICATION ET DESCRIPTION D'UNE GLYCOPROTEINE SERIQUE

ETUDE DE SON MODE D'ACTION PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACOLOGIQUE EN PRESENCE D'HISTAMINE

Soutenue le 5 juillet 1972

JURY :

Président

M. J.E. COURTOIS

Examinateurs

MM. Y. COHEN, J. AGNERAY, J.C. SCHWARTZ

COPEDITH - 70, rue de Flandre - 75 PARIS XIXe

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents -

Pour ce qu'ils m'ont donné et ce qu'ils m'ont permis de comprendre, pour leur indéfectible affection et leur inlassable confiance.

A Jean FEGER -

Pour ce dont il m'a entouré, pour le courage et l'optimisme qu'il m'a aidée à conserver devant certains problèmes.

A mes filles -

Pour ce qu'elles sont :

à Céline, pour son grand coeur et sa maturité,

à Marie-Laure, pour son sourire et sa bonne humeur,

à Bertille, pour la promesse qu'elle représente.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543517_0043

AVANT-PROPOS

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Emile COURTOIS pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de cette thèse. Ses conseils, ses encouragements ainsi que sa bienveillante et constante sollicitude m'ont aidée depuis qu'il a bien voulu m'intégrer dans son équipe d'enseignement de Biochimie. Je l'assure de mon respectueux attachement et je lui exprime mes sentiments de profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Yves COHEN a bien voulu s'intéresser à ce travail et accepter de le juger. Il nous a obligeamment donné accès à son laboratoire pour réaliser certaines expériences. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur Jean AGNERAY, vous m'avez accordé la chance de faire partie de votre équipe depuis sa constitution. Vous m'avez ainsi placée dans les meilleures conditions pour acquérir l'enthousiasme et la foi en la recherche tels que vous les manifestez. Vous m'avez fait bénéficier de vos conseils, de vos suggestions, de votre inlassable dynamisme. Qu'il ne soit permis de vous exprimer ma sincère reconnaissance, et de vous assurer de mon respectueux attachement.

Monsieur le Professeur Jean-Charles SCHWARTZ a accepté de se joindre aux membres du jury de cette thèse, je le remercie de manifester ainsi son intérêt pour le sujet ici exposé.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la coopération des membres de l'équipe constituée par Monsieur le Professeur AGNERAY.

Madame Geneviève DURAND et moi-même avons commencé une étroite collaboration devant certains problèmes techniques. Nous y avons pris ces habitudes de discussion que nous avons continuées à appliquer quand, à partir de l'étude des glycoprotéines mineures du sérum, Monsieur le Professeur AGNERAY m'a orientée plus particulièrement vers celle à laquelle s'intéressait déjà Madame DURAND.
Qu'elle trouve ici mes remerciements pour son aide ferme et amicale, ainsi que l'espoir de voir notre entente dans le travail et notre amitié continuer à cheminer de concert.

Le talent de pharmacologiste de Monsieur Bernard LEBEL a permis la réalisation d'une partie de ce travail. Je l'assure de mes remerciements pour son amicale et sympathique assistance.

Mademoiselle Catherine de BUTLER a apporté à la réalisation technique de ce travail son aide efficace, à l'ambiance de notre équipe son dynamisme et son énergie, je l'en remercie tout particulièrement.

Mademoiselle Marianne GOLOVTCHENKO, qui sait si bien allier science, conscience et disponibilité, trouvera ici l'expression de mes amicaux remerciements pour sa sollicitude et ses encouragements.

Que tous ceux qui, à des titres divers ont contribué à l'élaboration de ce travail, à des moments variés m'ont manifesté intérêt et amitié, sachent bien qu'ils ont leur place dans ma reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE : DONNEES PRELIMINAIRES 3

CHAPITRE I - HISTAMINE 5

I - DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES SUR L'HISTAMINE ET CONSEQUENCES QUANT A LA LIAISON HISTAMINE-RECEPTEUR 5

A - Formule - nomenclature - structures 5

B - Propriétés physiques et constantes d'ionisation 6

C - Formation de complexes métalliques 9

D - Distribution électronique 9

E - Application de ces considérations au mode d'action de l'histamine 9

II - FORMATION - LOCALISATION DE L'HISTAMINE 13

A - Origine de l'histamine 13

1/- Rôle de l'histidine - décarboxylase 13
2/- Origine exogène de l'histamine 13
3/- Origine endogène 14

B - Répartition dans l'organisme 14

1/- Répartition tissulaire 14
2/- Histamine des mastocytes 14

(a) Les mastocytes, leur nature 14
(b) Synthèse de l'histamine dans les mastocytes 15
(c) Fraction de l'histamine dans les mastocytes 15
(d) Libération de l'histamine dans les mastocytes 17

3/- Histamine tissulaire non mastocytaire 17

Pages

III - ROLE PATHOLOGIQUE DE L'HISTAMINE 18

CHAPITRE 2 - DONNEES CONNUES SUR LA PROTEINE 21

I - DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES 21

II - DONNES SUR L'ACTIVITE DE LA PROTEINE 22

DEUXIEME PARTIE : TECHNIQUES UTILISEES 25

CHAPITRE 1 - DOSAGE DE L'HISTAMINE 27

I - TECHNIQUE PHARMACOLOGIQUE 27

II - DOSAGE DE L'HISTAMINE RADIOMARQUEE 29

III - DOSAGE FLUORIMETRIQUE 30

CHAPITRE 2 - RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM 31

CHAPITRE 3 - EXTRAIT PHYTIQUE 33

CHAPITRE 4 - FILTRATION SUR GEL 35

CHAPITRE 5 - DIAFILTRATION - ULTRAFILTRATION 37

I - LES MEMBRANES 37

II - CELLULES DE DIAFILTRATION 37

III - AVANTAGES ET INCONVENIENTS 38

IV - APPLICATIONS 38

A - Définition de l'ultrafiltration et de la diafiltration 43

1/- Technique dite du "Wash out" 38
2/- Technique dite du "Wash In" 41

B - Méthodologie de la diafiltration 41

1/- Préparation de la membrane 41
2/- Mise en route de l'appareillage 41
3/- Etude de la perméabilité de la membrane et des caractéristiques de l'installation 41

C - Etude théorique 42

1/- Absence d'interaction petite molécule-membrane 42
2/- Rétention de la petite molécule par la membrane 45

Pages

3/- Liaison de la petite molécule à la membrane 46
4/- Liaison saturante de la membrane 46

CHAPITRE 6 - CHROMATOGRAPHIE SUR CARBOXY-METHYL-CELLULOSE 47

I - NATURE DE L'ECHANGEUR 47

II - FONCTIONNEMENT DE L'ECHANGEUR 47

III - PREPARATION DE L'ECHANGEUR ET DE LA COLONNE 47

A - Précyclage 47

B - Equilibrage 48

C - Elimination des particules fines 48

D - Montage de la colonne 48

E - Réactifs 49

F - Echantillon 49

IV - TECHNIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE 49

A - Application de l'échantillon 49

B - Elution 50

V - REGENERATION ET CONSERVATION DE L'ECHANGEUR 50

CHAPITRE 7 - SEPARATION SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE 51

I - DEFINITION 51

II - SEPARATION EN TUBES 52

A - Principe 52

B - Technique 52

C - Matériel 52

D - Formules des réactifs 52

E - Mode opératoire 53

III - SEPARATION EN GRADIENT DE CONCENTRATION EN GEL 55

A - Principe 55

B - Matériel 55

C - Réactifs 56

D - Mode opératoire 56

E - Résultats 58

Pages

CHAPITRE 8 - IMMUNO-ELECTROPHORESE QUANTITATIVE 59

MATERIEL ET TECHNIQUE 60

CHAPITRE 9 - DOSAGE DES CONSTITUANTS D'UNE GLYCO-PROTEINE 63

I - DOSAGE DE L'AZOTE α AMINE 63

II - DOSAGE DES HEXOSES 63

III - DOSAGE DES METHYL-PENTOSES 64

IV - DOSAGE DES OSAMINES 64

V - DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES 65

TROISIEME PARTIE : PREPARATION DE LA PROTEINE - ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE 67

CHAPITRE 1 - PREPARATION DE LA PROTEINE ET RESULTATS 69

CHAPITRE 2 - ESSAIS PRELIMINAIRES DE LA DIAFILTRATION 71

I - MEMBRANE XM 300 71

A - Sérum humain 71
B - Sérum de Porc 72
C - Conclusion 75

II - MEMBRANE XM 100 A 76

A - Sérum humain 76
B - Sérum de Porc 83

III - DISCUSSION GENERALE 83

IV - CONCLUSION GENERALE 84

CHAPITRE 3 - ESSAIS PRELIMINAIRES DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR CARBOXY-METHYL-CELLULOSE 87

I - INTRODUCTION 87

II - TECHNIQUES 87

III - RESULTATS 88

IV - CONCLUSION 91

CHAPITRE 4 - NOUVEAU PROTOCOLE DE PREPARATION 93

I - SERUM HUMAIN 93

A - Relargage par le sulfate d'ammonium 93

Pages

B - Précipitation phytique 93
C - Passage sur membrane XM 100 A 94
D - Passage sur carboxy-méthyl-cellulose 94

II - SERUM DE PORC 94

A - Relargage par le sulfate d'ammonium 94
B - Précipitation phytique 95
C - Passage sur membrane XM 100 A 95
D - Passage sur carboxy-méthyl-cellulose 95

CHAPITRE 5 - ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE 97

CHAPITRE 6 - ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE 101

I - CRITERES DE PURETE 101

A - Electrophorèse 101
B - Immuno-électrophorèse 101
C - Polyacrylamide 102
D - Gradient de concentration en gel 102
E - Immuno-électrophorèse quantitative 109

1/- Immuno-électrophorèse bidimensionnelle 109
2/- Tandem avec albumine et immunsérum polyvalent 109
3/- Tandem avec albumine et immunsérum anti-albumine 117
4/- Dosage selon la méthode de Laurell 117

II - DOSAGE DE CERTAINS CONSTITUANTS ET APPROCHE DE LA COMPOSITION 118

A - Carbone - Hydrogène - Azote 118
B - Protides 118
C - Saccharides 118
D - Acides aminés 123

III - RECAPITULATION DES RESULTATS PHYSICO-CHIMIQUES NOUVEAUX 123

QUATRIEME PARTIE : ETUDE DU MODE DE LIAISON 127

CHAPITRE I - ETUDES EXPERIMENTALES DE LA LIAISON ET DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS 129

I - DONNEES PHARMACOLOGIQUES CONNUES 129

II - NOUVELLES DONNEES SUR LE PHENOMENE PHARMACOLOGIQUE 130

III - DONNEES SUR LE PHENOMENE PHYSICO-CHIMIQUE 133

IV - CONCLUSIONS PRINCIPALES DE CE CHAPITRE 157

Pages

CHAPITRE 2 - COMPARAISON DES PHENOMENES PHARMACOLOGIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE 159

I - RECHERCHE D'UNE COMBINAISON HISTAMINE-PROTEINE EXISTANT DANS LE CADRE DU PHENOMENE PHARMACOLOGIQUE 159

II - ESSAI DE FORMATION DE LA COMBINAISON HISTAMINE-PROTEINE EN SE PLAÇANT DANS LES MEMES RAPPORTS DE CONCENTRATION QUE POUR LES ESSAIS PHARMACOLOGIQUES 160

III - AFFINITE DE LA PROTEINE POUR L'HISTAMINE DANS LE CADRE DU PHENOMENE PHYSICO-CHIMIQUE 162

IV - ESSAI DE DETERMINATION DE LA CONSTANTE D'ASSOCIATION PRESIDANT AU PHENOMENE PHARMACOLOGIQUE. 164

CHAPITRE 3 - INFLUENCE DES HYDROLYSES 173

I - PROTEOLYSE PAR LA TRYPSINE 173

II - PROTEOLYSE PAR LA PRONASE 174

III - HYDROLYSE PAR LA NEURAMINIDASE 177

IV - ATTAQUE ALCALINE 178

V - COMPARAISON DE L'ACTION DE LA NEURAMINIDASE SUR LES PHENOMENES PHARMACOLOGIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE 182

VI - COMPARAISON DE L'EFFET DE L'ATTAQUE ALCALINE SUR LES PHENOMENES PHARMACOLOGIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE 185

VII - CONCLUSIONS PRINCIPALES DE CE CHAPITRE 186

CINQUIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE 187

SIXIEME PARTIE : CONCLUSION GENERALE 195

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES FIGURES

	Pages
1 - Conformation de l'histamine (Selon KIER - 43)	7
2 - Ionisation de l'histamine à pH 7,4 (Selon ALBERT et SERJEANT - 5)	7
3 - Distribution électronique sur les atomes de l'histamine (d'après KIER - 43)	11
4 - Schéma d'une cellule d'ultrafiltration moléculaire	39
5 - Expression de la diafiltration	43
6 - Electrophorèse des fractions diafiltrées	85
7 - Electrophorèse des échantillons protéiques obtenus	103
8 - Electrophorèse en gradient de concentration en gel	105
9 - Etalonnage de l'électrophorèse en gradient de concentration en gel de polyacrylamide	107
10 - Immuno-électrophorèse bidimensionnelle	111
11 - Expérience de tandem	113
12 - Tandem avec Albumine et Immunsérum antisérum humain polyvalent	115
13 - Tandem avec Albumine et Immunsérum anti-albumine humaine	115
14 - Dosage de l'albumine selon la méthode de Laurell	119
15 - Expression de la diafiltration de chlorure de sodium	145
16 - Expression de la diafiltration de chlorure de sodium	145
17 - Expression de la diafiltration d'histamine	147
18 - Expression de la diafiltration d'histamine	147
19 - Affinité présidant au phénomène pharmacologique	169
20 - Courbes comparatives des chromatographies de filtration sur gel de Séphadex G 100 des hydrolysats	175
21 - Etude de la β élimination selon MONTREUIL	179

TABLE DES TABLEAUX

	Pages
I - Activité pharmacologique de Retenu XM 300 - Sérum humain	73
II - Electrophorèse de Retenu XM 300 - Sérum humain	73
III - Activité pharmacologique du Retenu XM 300 - Sérum de Porc	77
IV - Electrophorèse de Retenu XM 300 - Sérum de Porc	77
V - Activité pharmacologique de Retenu XM 100 A - Sérum humain	79
VI - Electrophorèse de Retenu XM 100 A - Sérum humain	79
VII - Activité pharmacologique de Retenu XM 100 A - Sérum de Porc	81
VIII - Electrophorèse de Retenu XM 100 A - Sérum de Porc	81
IX - Comparaison de l'activité biologique des échantillons protéiques avant et après passage sur carboxy-méthyl-cellulose	89
X - Activité pharmacologique des préparations obtenues	99
XI - Pourcentage de C-H-N de la préparation d'origine humaine (F 947) et de celle d'origine porcine (F 950)	121
XII - Pourcentage des constituants de la copule glucidique des deux préparations F 947 et F 950	121
XIII - Composition en acides aminés de deux préparations : F 947 (origine humaine) et F 950 (origine porcine) en µM d'acide aminé par mg d'échantillon	125
XIV - Incubation et fixation d'histamine par divers échantillons de protéine	135
XV - nMoles de dichlorhydrate d'histamine présentes par mg de protéine après formation et séparation de la combinaison histamine-protéine	139
XVI - Fixation d'histamine par la protéine. Comparaison du nombre de DMA par milligramme de protéine avant et après incubation	139
XVII - Comparaison du nombre de nanoMoles de dichlorhydrate d'histamine présentes par milligramme de fraction avant et après hydrolyse chlorhydrique	143
XVIII - Influence de la diafiltration à travers une membrane PM 30 sur la combinaison histamine-protéine	151
XIX - Comparaison des activités pharmacologiques avant et après passage sur membrane XM 100 A pour deux sérums, l'un de malade allergique, l'autre normal	155

Pages

XX - Détermination de la dose minimale active d'un échantillon protéique pur. Données numériques pour déterminer la constante de dissociation dans le cadre du phénomène pharmacologique 167

XXI - Etude comparative d'une fraction soumise à l'action de la neuraminidase (F 970) et d'une fraction témoin (F 969) 183

XXII - Etude comparative d'une fraction soumise à l'attaque alcaline (F 972) et d'une fraction témoin (F 971) 183

TABLE DES ABREVIATIONS

A° Angstrom

mm millimètre

cm centimètre

ng nanogramme

µg microgramme

mg milligramme

cg centigramme

g. gramme

ml millilitre

x ou DMA (Dose minimale active) = Unité d'activité se définissant comme la plus petite quantité de poudre ou de protéine qui, dissoute dans 1 ml de liquide de Tyrode, diminue au maximum l'action contracturante de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye, c'est-à-dire de 20 %.

$\frac{1 \text{ mg}}{x}$ = nombre d'unités d'activité par milligramme de poudre ou de fraction.

$\frac{P \text{ mg}}{x}$ = nombre d'unités d'activité contenues dans une fraction de poids P mg ou contenant P mg de protéines.

GP Glycoprotéine

PM Poids Moléculaire

M Molaire

DPM Désintégration par minute

INTRODUCTION

Les glycoprotéines sont très largement répandues, cependant leur importance et leur rôle sont restés longtemps méconnus.

Objet récent de l'intérêt de nombreux chercheurs, elles se sont vues associer, au fur et à mesure de leur individualisation des fonctions de transport ou d'initiation. Mais les termes de cette proposition s'orientèrent rapidement vers une inversion et l'on tenta de découvrir derrière un transport ou un rôle biologique précis la ou les glycoprotéines responsables.

Une sorte de canevas de recherche s'est alors dégagé :

- Préparation et isolement : Les glycoprotéines pondéralement majeures furent ainsi individualisées. Puis, on en vint à l'étude de glycoprotéines pondéralement mineures et qui nécessitent la mise en jeu de quantités importantes de matière première pour l'obtention de quelques milligrammes de produit pur.
- Vérification de pureté.
- Approche de fiche signalétique avec l'imprécision inhérente aux faibles quantités de produit pur accessibles et à l'imperfection des techniques actuelles.
- Analyse des phénomènes sur une base physico-chimique.
- Analyse des phénomènes dans leur contexte biologique.

Ces objectifs nécessitent la manipulation de nombreuses notions, la maîtrise de nombreuses techniques.

Aussi, actuellement, le chercheur ne fournit-il un rendement efficace qu'en faisant appel à un travail d'équipe, et, pour les points délicats, à la collaboration extérieure de spécialistes.

Ces problèmes se sont posés à nous pour étudier la glycoprotéine sérique, objet du travail présenté. Le canevas précédemment exposé a été celui suivi dans nos recherches et se trouve à la base du plan de thèse proposé :

Nous nous intéressons à une glycoprotéine sérique dont le rôle biologique est lié à l'histamine.

La première partie fait une synthèse des données théoriques concernant l'histamine et des données précédemment acquises, sur la glycoprotéine.

La seconde partie expose les diverses techniques utilisées, soit déjà connues, soit que nous avons mises au point pour mener à terme notre travail.

La troisième partie traite des essais préliminaires à la préparation puis, de la préparation elle-même en vue d'isolement de la glycoprotéine, de détermination des critères de pureté, des dosages de certains constituants en une approche de la fiche signalétique.

La quatrième partie traite du rôle de la glycoprotéine d'une part dans le cadre du phénomène physico-chimique et d'autre part dans le cadre du phénomène pharmacologique.

La discussion générale rappelle les nombreuses discussions partielles avant d'en faire une synthèse à la lumière de l'ensemble des résultats obtenus.

La conclusion générale résume les points essentiels dégagés.

PREMIERE PARTIE

DONNEES PRELIMINTAIRES

CHAPITRE I

HISTAMINE

Posant des problèmes de dosage spécifique, présente dans de nombreux points de l'organisme, provoquant des actions variables en fonction de l'organe, du lieu ou de l'espèce considérée, l'histamine a donné lieu à de nombreuses études, et a fait l'objet de nombreuses publications.

Nous avons utilisé quelques revues et articles généraux afin de faire une synthèse des données connues et des explications des phénomènes avancés (79 - 97 - 72 - 41 - 6).

I — DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES SUR L'HISTAMINE ET CONSEQUENCES QUANT A LA LIAISON HISTAMINE-RECEPTEUR.

L'histamine fut synthétisée par WINDAUS et VOGT en 1907.

Mais ses actions physiologiques, reconnues plus tard, ne furent décrites de manière détaillée pour la première fois, qu'en 1910 et 1912 par DALE et LAIDLAW (17).

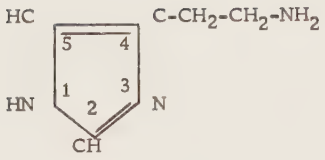
Elle fut isolée de l'ergot par KUTSCHER en 1910, puis reconnue dans la muqueuse intestinale d'où MELLANBY et TWORT l'isolèrent en 1912 et suggérèrent que sa formation pourrait résulter d'une action bactérienne sur l'histidine d'origine alimentaire et présente dans le contenu intestinal.

C'est à ABEL et KUBOTA (1) que revient le mérite, en 1919, de montrer la présence de l'histamine comme constituant normal de nombreux tissus.

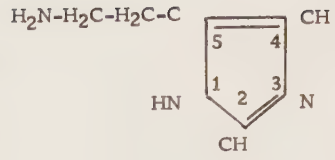
A — Formule, nomenclature et structure

L'histamine est l'amino éthyl 4 ou 5-imidazole.

Par convention, l'azote du noyau porteur d'un hydrogène porte le numéro 1 et la numérotation se fait dans un sens tel que le second azote porte le numéro le plus faible possible. Comme on peut distinguer deux imidazoles tautomères, l'histamine coexiste sous deux formes I et II et peut donc être écrite sous ces mêmes deux formes.



I



II

Certains auteurs cependant sont en faveur d'une plus grande fréquence de la forme I :

- Car dans les dérivés de l'imidazole autres que l'histamine, les substituants attracteurs d'électrons stabiliseraient la forme I : la protonation ici de la chaîne éthylamine jouerait dans ce sens (LAVIRON, 51 - GALLO et Al., 27) ;
- Par étude de la complexation de l'histamine par certains métaux : la forme I donne avec le métal un cycle à 6 liaisons, la forme II un cycle à 7 liaisons.

Toutefois, aucun de ces auteurs n'infirme l'existence de la forme II.

Des divers travaux faits sur l'étude de la structure cristalline aux rayons X, KIER (43), par la méthode des calculs des orbitales moléculaires à partir de la forme I, attribue à la chaîne éthylamine deux conformations d'énergie voisine et entraînant une distance différente entre l'azote de la chaîne et l'azote non substitué intranucléaire (Fig. 1).

Soit 4,55 A° et 3,60 A° respectivement pour les formes a et b.

B — Propriétés physiques et constantes d'ionisation

L'histamine base est très soluble dans l'eau, et forme de nombreuses liaisons hydrogènes.

Sa solution aqueuse ne possède pas un spectre d'absorption dans l'ultraviolet et la lumière visible utilisable comme méthode analytique, car elle n'a pas de maximum d'absorption dans la zone 210 à 700 nm.

Elle présente deux basicités en solution aqueuse, pour lesquelles de nombreux auteurs ont confirmé les constantes d'ionisation attribuées par LEVY (53) : le pKA de l'amine de la chaîne et du noyau serait respectivement de 9,70 et 5,90.

Dans le milieu physiologique où le pH est voisin de 7,4, l'amine de la chaîne est ionisée par fixation d'un proton dans plus de 99 p. cent des molécules alors que le noyau est ionisé par protonation dans environ 3 p. cent des molécules seulement (ALLAIN, 6).

En résumé, on peut dresser selon ALBERT et SERJEANT (5) un tableau des formes possibles et de leur fréquence à pH 7,4 (Fig. 2).

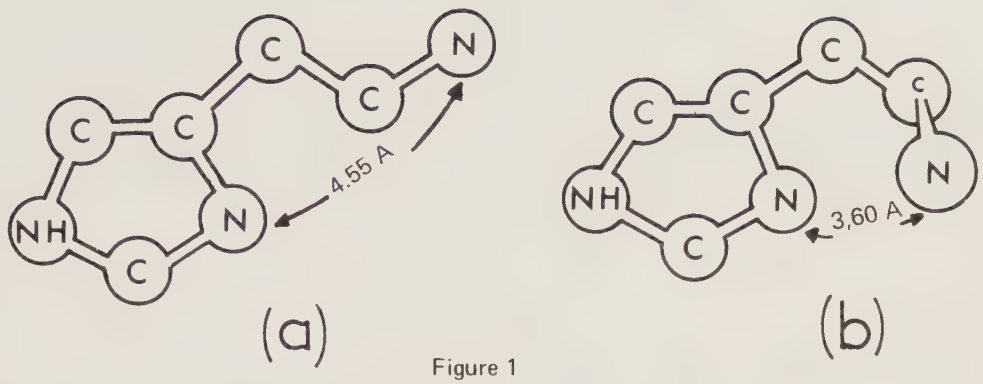


Figure 1

Conformation de l'Histamine (selon Kier -43-)

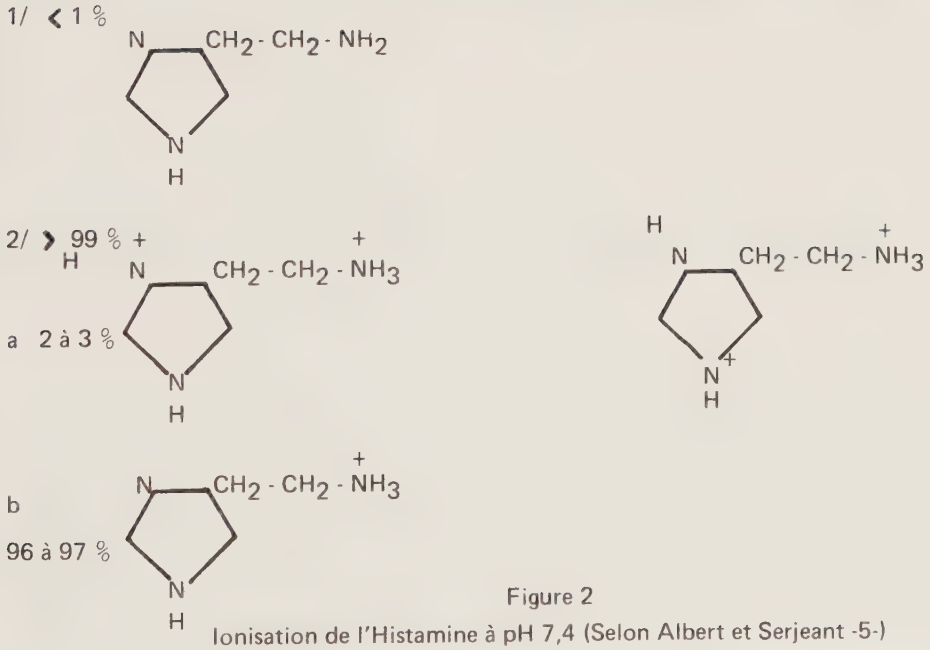


Figure 2

Ionisation de l'Histamine à pH 7,4 (Selon Albert et Serjeant -5-)

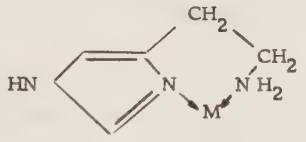
N.B. Pour ne pas trahir la pensée des auteurs nous adoptons leur mode d'écriture. Il est d'ailleurs à noter que la représentation plane est très imparfaite.

C — Formations de complexes métalliques

La formation de sels ou de complexes avec l'histamine a fait l'objet de nombreux travaux.

Avec ALLAIN (6), on peut retenir que :

- le cation métallique Me (cuivre, nickel, cobalt ou zinc) vient se lier aux deux azotes qui possèdent un doublet libre selon la formule (respectant l'écriture de l'auteur)



- selon l'indice de coordinence du cation métallique, une, deux, ou même trois molécules d'histamine pourront être complexées par molécule de cation.

Cependant, ces expériences ont été effectuées in vitro, ne préjugeant pas des conséquences sur l'activité de l'histamine in vivo où plusieurs molécules entrent en compétition vis-à-vis de l'histamine.

De même, dans l'effet inhibiteur de certains cations métalliques (Cu, Zn, Ni, Co) sur l'action contracturante de l'histamine sur l'iléon de Cobaye, on ne peut pas attribuer cet effet à la complexation de l'histamine (TRETHEWIE, 95).

D — Distribution électronique ;

Les calculs des électrons π sur le noyau imidazole ont été faits par BROWN et HEFFERMAN (12) et la répartition des charges nettes $\sigma + \pi$ sur la forme monocationique de KIER (43) qui propose la répartition ci-après : (Fig. 3, page 11).

Ce qui l'amène aux constatations suivantes :

- L'azote intracyclique, non substitué, en 3, a une charge négative de (- 1,045), il est donc nucléophile et aura un caractère basique, c'est-à-dire fixera facilement un proton ;
- L'autre azote intracyclique, en 1, a une charge négative plus faible (- 0,283) et qui tend à être compensée par la charge positive (+ 0,299) de l'hydrogène substituant ;
- Le dernier azote, l'azote protoné de la chaîne, porte, ce qui est inhabituel, une charge négative (- 0,218). Mais étant donné les charges positives de chacun des hydrogènes substituants, la charge résultante de l'ensemble N-H3 est largement positive.

E — Application de ces considérations au mode d'action de l'histamine

Nous venons de voir que, s'il existe une conformation préférentielle de l'histamine, celle-ci peut se présenter sous d'autres formes.

Or, l'histamine a plusieurs actions physiologiques dont les principales sont :

- contraction de certains muscles lisses (bronches, utérus, intestin, artères et veines), relâchement au contraire des musculatures des artérioles les plus fines, des capillaires et veinules,
- augmentation de la perméabilité capillaire et vasodilatation,
- augmentation de certaines sécrétions en particulier au niveau gastrique (déclenchement d'une sécrétion de type acide).

Peut-on envisager qu'il existe des récepteurs différents en fonction de chaque action et adaptés à chaque forme d'histamine ?

ASH et SCHILD (7) ont montré que les récepteurs de l'histamine peuvent se différencier en au moins deux classes. Par emploi des analogues de l'histamine, ils ont pu établir que le récepteur H1 de l'iléon de Cobaye a une structure différente de celle du récepteur H2 de l'utérus de Rat ou de l'estomac.

Ceci est corroboré par le fait que les anti-histaminiques ne possèdent pas une action antagoniste égale vis-à-vis des diverses activités histaminiques.

DANIELLI et Al. (18) considèrent l'action anti-histaminique de la Triprolidine alors que la distance entre les atomes d'azote de cette molécule est de $4,8 \pm 0,2$ A°, donc proche de celle de 4,55 A° dans la forme (a) de l'histamine ; ils proposent cette forme (a) de l'histamine comme étant celle se combinant au récepteur H1. On n'a pu trouver encore d'anti-histaminique bloquant les récepteurs H2 pour confirmer la seconde partie de la proposition, à savoir que ceux-ci correspondent à la forme (b) de l'histamine.

Au niveau du récepteur, quel qu'il soit, comment peut-on expliquer l'action de l'histamine ?

Il y aurait modification transitoire du récepteur dont l'effet ultime consisterait en une variation du potentiel électrique fugace, et déclenchant l'action physiologique observée.

ALLAIN (6) pense que le mode le plus probable serait le transfert d'un proton du récepteur sur l'azote (3), nucléophile du noyau imidazole de l'histamine, transfert qui peut s'effectuer très facilement étant donné les constantes d'ionisation de l'histamine.

Une seconde possibilité, beaucoup plus difficile à réaliser et donc moins fréquente, si elle existe, que la première, serait le transfert du proton fixé sur l'azote intracyclique en 1 vers un récepteur qui devrait avoir un site très nucléophile ou un mécanisme circulaire concerté.

Les travaux d'ACKERMANN (2) puis de ROCHA E SILVA (78), sur les possibilités d'inhibition des effets de l'histamine par addition d'histidine et d'arginine ou de son dérivé la benzoyl-A-arginine-amide, ont amené ce dernier auteur à proposer l'existence sur la molécule d'histamine de deux pôles :

- le pôle "haptophore" représenté par le radical imine intracyclique, n'aurait qu'un pouvoir de fixation ;

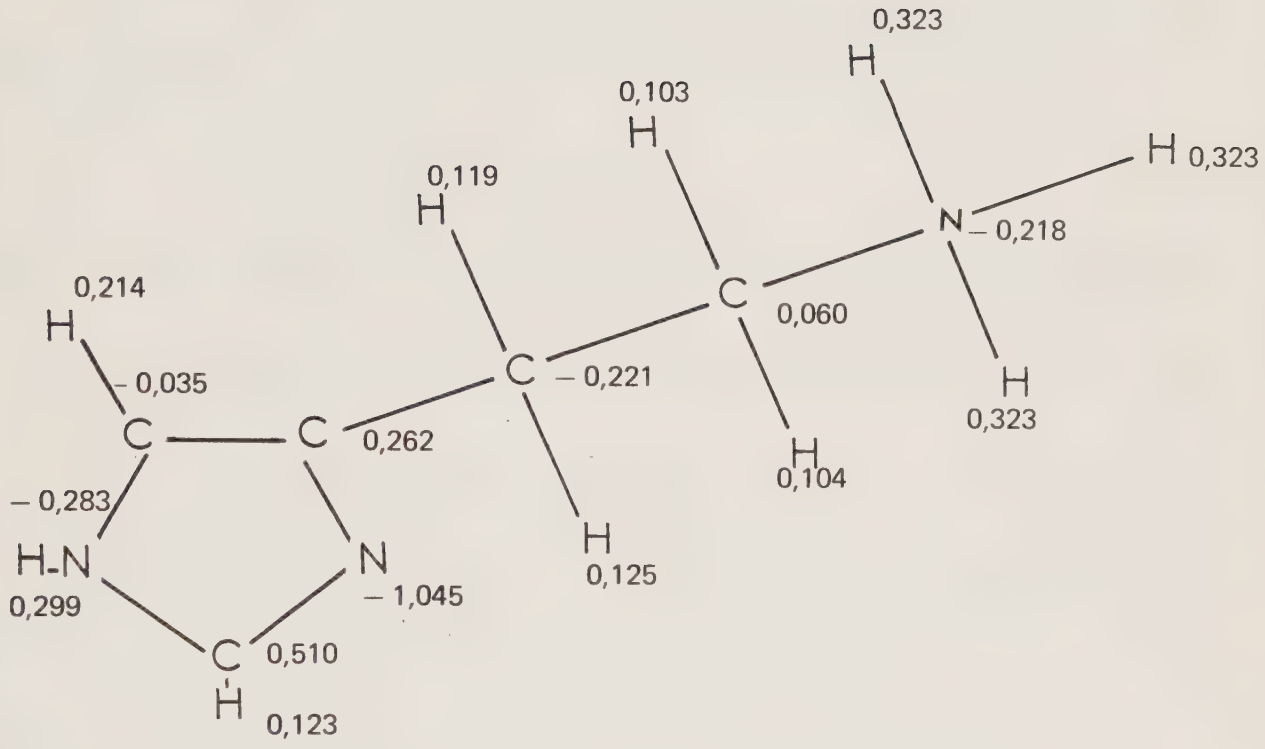


Figure 3

Distribution électronique sur les atomes de l'Histamine (d'après Kier - 43)

- le pôle "toxophore", représenté par le groupement aminé de la chaîne latérale, serait déterminant pour l'activité pharmacologique.

Dans l'histidine ou l'arginine, ce groupement serait bloqué par un -COOH proximal empêchant l'action pharmacologique, alors que le pôle "haptophore" présent et non bloqué permet la fixation de l'histidine ou de l'arginine à la place de l'histamine.

II — FORMATION, LOCALISATION DE L'HISTAMINE.

A — Origine de l'histamine

L'histamine peut venir de l'alimentation, ou être formée dans l'intestin, on la considère alors comme étant d'origine exogène. Elle peut être formée in situ dans les tissus, on la considère alors comme étant d'origine endogène.

1 - Rôle de l'histidine décarboxylase

Que ce soit dans l'intestin par les bactéries de la flore intestinale, ou dans les tissus, l'histidine est décarboxylée en histamine par l'histidine décarboxylase.

Cette enzyme a pour coenzyme le pyridoxal-5'-phosphate. Elle fut découverte chez les mammifères dès 1936 par WERLE (99). Mais SCHAYER (83) montra qu'en réalité existent deux enzymes :

- l'histidine décarboxylase non spécifique, qui décarboxyle tous les acides aminés aromatiques et ne joue aucun rôle dans la formation de l'histamine,
- l'histidine décarboxylase spécifique, très abondante dans les mastocytes, surtout présente dans les tissus de croissance rapide (foie, rat foetal), seule forme à considérer ici.

2 - Origine exogène de l'histamine

L'histamine peut être directement ingérée.

Elle peut également être formée à partir de l'histidine grâce à l'histidine décarboxylase des bactéries de la flore intestinale.

On connaît deux destinées possibles à l'histamine exogène :

- soit une inactivation par conjugaison en acéthylhistamine et élimination par le rein,
- soit une fixation par la mucine des sucs gastriques ou intestinaux.

COHEN (15) confirme cette hypothèse : chez le Rat, par perfusion vasculaire des anses intestinales, il n'y a pas passage d'histamine dans la circulation, grâce à la mucine libérée des cellules mucigènes détruites ou lésées par la polivinylpyrolidone du liquide de perfusion.

3 - Origine endogène

L'histamine endogène proviendrait de la décarboxylation in situ de l'histidine comme l'a montré SCHAYER (81) après injection d'histidine radio marquée.

B — Répartition tissulaire.

1 - Répartition tissulaire

L'histamine endogène, chez l'Homme, est présente dans tous les tissus, en plus ou moins grande quantité. Aucun organe ne semble en contenir une concentration permettant de penser à un lieu de synthèse ou un lieu de stockage unique à partir duquel il y aurait dissémination dans les autres organes.

Cependant, on doit noter l'existence d'une plus grande concentration d'histamine dans les tissus de revêtement cutanés, muqueux, autour des petits vaisseaux et dans les organes à muscles lisses.

Au niveau du système nerveux central, on note la présence d'histamine, à la fois dans les structures non neuroniques (tiges de l'hypophyse) où elle viendrait de mastocytes, et dans les structures neuroniques, ne contenant pas de mastocytes, mais où l'histamine serait liée à des particules, de taille variable selon les auteurs :

- petites si l'on se réfère aux dosages biologiques de CARLINI et GREEN (13) ;
- plus grosses si l'on se réfère aux dosages biologiques de MICHAELSON et WHITTAKER (57).

A ce niveau, elle est particulièrement abondante chez le Chien dans les fractions terminales des nerfs et dans les vésicules synaptiques d'homogénats de thalamus et d'hypothalamus, PHYLLIS (72).

Or, si l'on excepte les structures neuroniques, tous ces tissus où l'on trouve l'histamine, ont en commun la propriété d'être riches en mastocytes.

2 - Histamine des mastocytes

(a) - Les mastocytes, leur nature

Ce sont des cellules d'une morphologie particulière. Elles ont de 10 à 15 µ de diamètre.

On les trouve d'une part dans les tissus conjonctifs abondamment vascularisés, en particulier la plèvre du poumon, la capsule du foie. Dans le sang, on considère que les basophiles précurseurs de la moelle osseuse avant de devenir des éléments du sang périphérique, ont de telles analogies avec les mastocytes qu'on peut les assimiler à ces cellules.

Quelle que soit leur localisation, ils sont caractérisés par l'existence de

250 à 500 granules cytoplasmiques par cellule. Ces granules, de 0,5 à 1 µ, ont la propriété d'être le principal lieu de synthèse et également de stockage de l'héparine. Ce polysaccharide acide constituerait environ 30 p. cent du poids sec du granule ; il est lié de manière covalente à la partie protéique constituant 30 p. cent du poids sec également ; si l'on admet que l'histamine mastocytaire est confinée aux granules, elle constituerait environ 3 p. cent du poids sec de ceux-ci (LAGUNOFF, 48).

(b) - Synthèse de l'histamine dans les mastocytes

La corrélation entre mastocytes, taux d'histamine libérable et taux d'héparine, est signalée par de nombreux auteurs : RILEY et WEST (74), MOTA et JUNCQUEIRA (63), GRAHAM et Al. (33), GRAHAM et Al. (34).

Pensant à une formation presque entière de l'histamine dans les mastocytes, SCHAYER (82) observe que l'histidine décarboxylase est une enzyme adaptative, susceptible d'atteindre des taux élevés dans les mastocytes en voie de régénération et dans les mastocytes des tissus soumis à un traumatisme. Le coenzyme Pyridoxal-phosphate serait localisé dans le cytoplasme intergranulaire (BENDITT, 8).

L'histidine à décarboxyler serait captée par un processus actif (DAY et GREEN, 19).

(c) - Fixation de l'histamine dans les mastocytes

Les mastocytes peuvent-ils capter l'histamine non synthétisée par eux ?

Il semble qu'en fait, dans des conditions normales, les concentrations d'histamine des mastocytes soient dues beaucoup plus à la synthèse in situ qu'à la captation de cette amine. Dans les conditions physiologiques, les taux sanguins n'augmentent pas au point de perturber le taux de base de ces cellules. Mais quand les taux sanguins sont appelés à s'élever, par exemple après injection d'histamine,les mastocytes pourraient servir de lieu de stockage et de masquage (GREEN, 38). De même que,lorsque la synthèse d'histamine tissulaire s'accroît, les mastocytes presque toujours présents capteraient une partie de cette histamine et réduiraient d'autant la quantité d'histamine libre susceptible de devenir circulante (SCHAYER, 85).

FURANO et GREEN (26) ont montré que dans des cellules néoplasiques des souris, les amines (histamine, et 5 hydroxy-tryptamine qui est absente normalement chez l'Homme, mais présente en bien moindre quantité que l'histamine chez le Rat et la Souris), captées par les mastocytes entrent dans les granules, à concurrence semble-t-il de la saturation des sites des liaisons ; au-delà de ce seuil, les amines restent dans le surnageant de centrifugation du cytoplasme où leur renouvellement est supérieur à celui intragranulaire. Malheureusement, des expériences semblables n'ont pu être réalisées sur des mastocytes humains et normaux, qui contiennent davantage de granulations que les cellules néoplasiques, et dont le surnageant (où se trouvent les amines) a un volume moindre ; on pourrait penser alors que la saturation des sites de liaison intragranulaires serait plus longue à atteindre.

Comment l'histamine serait-elle fixée (masquée) dans les mastocytes ou plus exactement dans les granules des mastocytes ?

La concentration d'histamine dans les granules est mal connue : entre 10 M calculée par GREEN (38) et 0,06 M (UVNÄS, 96). Ainsi, même dans le cas d'estimation minimale, on voit que les granules permettent la rétention de quantités très supérieures à la dose mortelle d'histamine, la protégeant également de la dégradation enzymatique (GREEN et DAY, 37).

La présence d'héparine ou d'autres mucopolysaccharides a fait penser au rôle de ces substances sans que l'on ait pu encore exclure le rôle d'autres substances acides également présentes telles que taurine, acide cystéique, adénosine-triphosphate et cérébroside-sulfate (GREEN et Al., 36).

Quelles sont, au pH physiologique et dans les granules des mastocytes, les caractéristiques de l'héparine qui ont permis de l'envisager comme point de fixation de l'histamine ?

L'héparine est constituée d'unités alternées d'hexosamine et acide uronique. Elle présente des groupements acides, sulfates et carboxyliques, qui tous deux sont dissociés au pH 7,4. On peut donc l'assimiler à un polymère échangeant des cations susceptibles de contracter des liaisons salines par ses groupements acides, avec les amines porteuses de charges positives. Mais si l'on admet l'analogie avec un échangeur d'ions, GREEN (35) a montré qu'il faut envisager l'existence d'autres phénomènes tels que des liaisons hydrogènes, solubilité, effet de tamisage et équilibre de Donnan.

Les liaisons hydrogènes sont importantes à double titre :

- elles augmentent l'ionisation des groupements acides de l'héparine (LASKOWSKI et SCHERAGA, 49), jouant donc un rôle dans les liaisons avec la fonction amine de l'histamine ;
- elles influencent la forme de l'héparine. Si on admet avec STONE (93) que l'héparine se présente comme une hélice pouvant se lier à l'histamine sans rompre sa conformation, cette structure permet à la fois de proposer davantage de sites de fixation que ne le ferait un enroulement au hasard (JACOBSON, 40), tout en limitant les possibilités de liaison et augmentant donc les chances de spécificité.

D'autres facteurs peuvent jouer. En particulier certains métaux peuvent former avec les polysaccharides acides des complexes susceptibles de lier les amines à leur tour (SCHWEIGER, 89).

On a pu démontrer en particulier (KERP, 42) que héparine et zinc lient quatre fois plus d'histamine que héparine seule, or du zinc est présent dans les mastocytes. Le zinc lierait l'histamine par l'intermédiaire de l'azote tertiaire seul ou par l'azote tertiaire et l'amine primaire (LI et Al., 54), avec une ou deux molécules d'héparine par l'intermédiaire de ces groupements hydroxyles, sulfates ou carboxyles.

Il ne faut pas oublier que l'histamine porte un azote tertiaire à charge négative élevée, susceptible d'accepter un proton de l'héparine.

Quant aux complexes par transfert de charge, leur existence n'a pu être démontrée (GREEN, 38).

(d) - Libération de l'histamine des mastocytes

Les mastocytes répondent par une dégranulation et une libération d'histamine aux nombreux stimuli, physiques ou chimiques.

Parmi les stimuli chimiques provoquant une décharge active de l'histamine, citons les antigènes, et des composés synthétiques comme le 48/80, produit de condensation de la p.-méthoxyphénéthyl-méthylamine et du formaldéhyde (PATON, 70). In vivo, les mastocytes abdominaux peuvent se recharger en histamine à nouveau en deux semaines. Lorsque la libération n'est que partielle, les cellules retiennent les granules et l'histamine résiduels (UVNÄS, 96).

On connaît in vitro la facilité de déplacement de l'histamine granulaire par des concentrations en sels égales à celles du milieu environnant, dans ces conditions, comment expliquer que la concentration du potassium intracellulaire (0,2 M), suffisamment élevée pour libérer plus de 90 % de l'histamine du granule isolé, ne provoque pas ce même phénomène in vivo ?

La micrographie électronique des mastocytes a montré que souvent les granules sont associés à une membrane qui joue un rôle protecteur vis-à-vis des fortes concentrations ioniques (COMBS et Al., 16).

La libération d'histamine, selon LAGUNOFF (48) serait alors due à une extrusion du granule de ce sac protecteur dans le milieu ionique ambiant, ou à une rupture de la membrane qui permettrait aux ions intracellulaires d'être au contact du granule.

Dans ce cas, il conviendrait peut-être de considérer les granules comme des éléments du réticulum endoplasmique.

3 - Histamine tissulaire non mastocytaire

Deux faits ont amené à penser que les mastocytes n'étaient pas l'unique lieu de stockage de l'histamine.

1)- Le composé 48/80, déjà cité ci-dessus, qui a pour propriété de libérer l'histamine des mastocytes, ne libère pas toutes les réserves d'histamine (MOTA et Al., 64) ;

2)- On peut mal expliquer comment l'histamine des mastocytes pourrait jouer un rôle de régulateur physiologique, étant donné son renouvellement lent, qui demande plusieurs semaines (SCHAYER, 84).

Des expériences chez l'animal à l'aide du composé 48/80 ont effectivement montré, avec des chiffres variables en fonction des espèces et des organes considérés, qu'il existe au niveau de vraisemblablement tous les tissus une histamine non mastocytaire.

Des travaux de BRODIE et Al. (11) sur l'histamine non mastocytaire, il résulte que :

- la vitesse de formation de cette histamine est particulièrement élevée, suggérant un rôle important dans ses lieux de localisation ;

- sa concentration est particulièrement élevée dans les glandes exocrines d'où elle est libérée par stimulation cholinergique, en particulier au niveau des glandes sous-maxillaires. Elle en disparaît rapidement pour n'être retrouvée pratiquement que dans la salive sous forme de métabolites. La formation de salive nécessiterait peut-être la présence de réserves d'histamine, la pilocarpine étant un agent général de libération de l'histamine à partir des glandes exocrines, soit par stimulation des récepteurs para-sympathiques, soit par action directement sur les réserves d'histamine ;

- au niveau des glandes gastriques et intestinales , la production de suc gastrique est induite par la gastrine, celle de suc pancréatique et de bile, par la sécrétine ; mais ces sécrétions seraient également liées à l'histamine, dont l'action resterait locale, ne s'exerçant que dans les cellules mêmes où elle est produite. Ce serait là la différence avec une hormone qui est véhiculée par le sang et vient agir au niveau de récepteurs de l'organe considéré. On pourrait la comparer à l'AMP cyclique, médiateur commun des sécrétions au niveau des cellules réceptrices du système sympathique, quel que soit le stimulus (BRODIE et Al., 11) ;

- il y aurait un lien étroit entre utilisation et synthèse : la libération d'histamine augmenterait sa vitesse de formation, alors que l'atropine, en diminuant son utilisation, diminuerait cette même vitesse de synthèse ;

- l'histidine décarboxylase ayant été décrite par SCHAYER (86) comme une enzyme adaptative, on pourrait aussi penser qu'une augmentation du taux de l'histamine inhibe l'enzyme alors qu'une diminution de ce même taux lève l'inhibition.

III – ROLE PATHOLOGIQUE DE L'HISTAMINE

Il ne nous appartient pas de définir ici le rôle physiologique très complexe de l'histamine.

Nous ne nous attacherons qu'au rôle pathologique.

Celui-ci peut se manifester dans deux sortes de circonstances :

- lors d'une intoxication alimentaire, par ingestion d'aliments avariés (souvent des poissons) contenant de grandes quantités d'histamine, fréquemment accompagnée d'autres amines. Etant donné la faible absorption intestinale, il faut alors ingérer des doses considérables d'histamine, pour observer des accidents , à moins que le sujet ne soit déjà sensibilisé par un état allergique préexistant ;

- lors de libération d'histamine endogène, stockée jusque là sous forme inactive, et participant à des manifestations allergiques ou anaphylactiques. Cette libération serait, selon KAHLSON et ROSENGEEN, suivie d'une phase accélérée de formation intracellulaire (41) expliquant la relative inefficacité des antagonistes de l'histamine administrée dans l'anaphylaxie.

Nous avons vu (page 17) que les mastocytes répondent par une dégranulation et une libération d'histamine aux stimuli chimiques.

Peuvent être qualifiés de tels, les antigènes ainsi que les substances dites "histamino-libératrices". On ne connaît pas le mécanisme exact de cette libération. On ne peut qu'observer ce qui se passe alors : le taux d'histamine libre augmente fortement au niveau des organes et au niveau du sang, provoquant des manifestations bien connues, caractéristiques de l'allergie.

Interviennent alors deux processus possibles d'inactivation :

- soit une transformation enzymatique en dérivés moins actifs ou inactifs qui seront ensuite excrétés ;
- soit une captation au niveau de certains tissus.

Ce phénomène de captation de l'histamine au niveau des tissus est à rapprocher d'une captation de l'histamine par un facteur sérique, qui serait responsable de la diminution d'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye en présence de plasma de sujet normal, étudié par PARROT et Al., (68).

Ce facteur sérique joue-t-il un rôle d'inactivateur de l'histamine ou bien n'est-il qu'un simple système de transport au niveau du sang ?

Pour essayer d'approcher la réponse à cette question, nous avons entrepris d'étudier et de comparer :

- les phénomènes observés au niveau de l'iléon isolé de Cobaye entre iléon, protéine et histamine, que nous pouvons qualifier de phénomène pharmacologique ;
- et les phénomènes observés entre protéine et histamine, que nous pouvons qualifier de phénomènes physico-chimiques.

CHAPITRE II

DONNEES CONNUES SUR LA PROTEINE

La diminution d'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye a été signalée par PARROT et Al. (68) dans le plasma et rapportée à une protéine que les auteurs pensent être absente ou inactive dans le sérum de malades allergiques.

I — DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES

Nous nous sommes attachés dans un premier temps à isoler cette protéine, présente en quantité mineure dans le plama. Nous nous sommes heurtés à la difficulté de la suivre par méthode électrophorétique ou immuno-électrophorétique. En effet, nous ne connaissions aucune de ses caractéristiques au départ, puis au fur et à mesure que nous l'avons mieux cernée, nous nous sommes aperçus que la protéine cherchée prenait très mal les colorants des protéines totales. Il nous fallait donc pour espérer la déceler utiliser des concentrations qui :

1)- soit étaient impossibles à réaliser, car nous atteignions la limite de solubilité,

2)- soit nous donnaient du fait des autres composants des colorations difficilement interprétables.

Aussi, avons-nous particulièrement apprécié l'étroite collaboration qui s'est créée avec Mr LEBEL et qui, tout au long des diverses étapes du fractionnement, nous a permis de déterminer par méthode pharmacologique dans quelle fraction se trouvait la protéine, quelle était la valeur de son unité d'activité (voir définition p. 2 chap.1 - II, p. 31 partie), l'enrichissement obtenu et éventuellement l'augmentation globale d'activité.

De précédents auteurs avaient déjà noté la stabilité et la solubilité du facteur responsable dans l'acide phytique (LABAT et Al., 46).

Le relargage par le sulfate d'ammonium nous a permis de précipiter la protéine entre 2,5 et 3,0 M à pH 7, d'exclure sa nature immunoglobulinique et de constater une importante augmentation globale d'activité.

La chromatographie sur gel de Séphadex G 200 à partir de sérum ou de fraction I, II, III de Cohn, montrait un Ve/Vo compris entre 1,46 et 1,76 et faisant prévoir un poids moléculaire apparent légèrement supérieur à celui des IGG. A ce stade de préparation, l'immuno-électrophorèse ne montrait que deux arcs respectivement de mobilité β et pré-albuminique (PARROT et Coll., 69).

L'électrophorèse préparative en gradient de densité de saccharose à pH 8,2 séparait les deux facteurs de mobilité différente et permettait d'attribuer l'activité au facteur de mobilité pré-albuminique. En même temps, était révélé un enrichissement considérable. La mobilité pré-albuminique fut confirmée sur agarose et sur acétate de cellulose.

L'électrofocalisation en gradient de saccharose et d'ampholine permettait de proposer un point iso-électrique de $4,0 \pm 0,1$.

A ce stade ultime de préparation, nous avions une protéine presque pure. Nous pouvions faire un bilan de l'enrichissement et de l'augmentation globale d'activité.

Nous pouvions également proposer une concentration sérique située entre 5 et 10 mg/l (DURAND et Al., 23).

Ces conclusions nous amenaient à proposer pour les deux sérums le plan de préparation suivant :

- Relargage par le sulfate d'ammonium 2,5 M - 3 M, pH 7 ;
- Précipitation phytique à pH 2,10, acide phytique 0,1 N ;
- Chromatographie sur Séphadex G 200 ;
- Electrophorèse en gradient de saccharose ;
- Electrofocalisation en gradient de saccharose et ampholine.

Les expériences entreprises parallèlement sur sérum humain et sérum de Porc aboutissaient aux mêmes conclusions quant aux propriétés et donc à un mode éventuel de préparation de la protéine.

De plus, les deux préparations obtenues en suivant ce mode opératoire présentent la même activité sur le test pharmacologique soit 500 000 unités par milligramme de poudre lyophilisée, preuve d'un haut degré de purification. Mais la technique d'OUCHTERLONY (67) d'immunodiffusion soit de protéine humaine contre l'immunsérum anti-sérum de Porc, soit de protéine de Porc contre l'immunsérum antisérum humain n'ont montré aucune communauté antigénique (DURAND, 22).

II – DONNEES SUR L'ACTIVITE DE LA PROTEINE

Au cours du relargage par le sulfate d'ammonium, nous avions révélé une activité biologique, le facteur d'enrichissement global étant de 10.

Cette révélation d'activité par contre n'apparaissait pas dans le sérum d'allergique.

Par incubation d'une fraction active de relargage avec de l'histamine, Durand mettait en évidence un appauvrissement d'activité, le facteur de division étant de 10 (22).

L'analogie entre facteur de multiplication et de division amenait à expliquer l'enrichissement lors du relargage par le détachement de molécules d'histamine, d'un site de fixation assez solide pour que seul un traitement brutal comme le relargage l'en détache. Il existerait d'autre part un site de fixation labile d'où l'histamine se détacherait par simple dialyse.

La chromatographie sur gel de Séphadex G 25 permet de séparer les molécules protéiques, qui sont exclues du gel, des petites molécules comme l'histamine, qui sont éluées plus tardivement. Après incubation dans du liquide de Tyrode d'une fraction active et de dichlorhydrate d'histamine la chromatographie sur G 25 a permis de séparer un complexe histamine-protéine de la molécule d'histamine libre. L'histamine utilisée est radio-marquée au ^{14}C sur le C 2 du noyau imidazole, son dosage est effectué par mesure de la radio-activité β émise.

Mais l'adsorption d'une quantité importante d'histamine par le Séphadex amenait à utiliser la chromatographie sur Biogel P 10 qui permettait de confirmer les résultats précédents.

Nous avions ainsi obtenu des données physico-chimiques sur la protéine et un schéma de préparation, des preuves de l'existence d'une combinaison entre la protéine et l'histamine, combinaison que l'on pouvait supposer mettre en jeu deux sites : l'un labile, l'autre plus solide.

Notre but premier fut d'obtenir la protéine dans un haut état de pureté. Celle-ci est présente à des concentrations très faibles dans le plasma. Aussi, avons-nous cherché à prendre comme matière première des plasmas les plus riches possibles en principe actif.

Dans l'espoir de diminuer au maximum les manipulations, en nous appuyant sur les caractéristiques déjà déterminées, et en fonction à la fois des rendements constatés et des difficultés opératoires, nous avons cherché à garder les étapes les plus intéressantes déjà vues, et à trouver d'autres méthodes plus rentables.

Dans un deuxième temps, la protéine ainsi obtenue, nous avons appliqué quelques méthodes analytiques pour déterminer son degré de pureté, vérifier ou préciser certaines données physico-chimiques.

En troisième lieu, maintenant que nous avions une protéine pure, nous avons procédé à la détermination qualitative et éventuellement quantitative de certains constituants.

Enfin, dans une quatrième partie, et en utilisant la protéine pure obtenue, ce qui nous permettait de supprimer certaines propriétés attribuables à des impuretés, nous avons essayé de mieux connaître le mode de captation et de libération de l'histamine par la protéine considérée.

DEUXIEME PARTIE

TECHNIQUES UTILISEES

CHAPITRE I

DOSAGE DE L'HISTAMINE

Nous avons fait appel à trois sortes de techniques pour doser ou vérifier l'activité de l'histamine. Nous allons les exposer successivement.

— TECHNIQUE PHARMACOLOGIQUE

Elle nous a permis de quantifier la diminution de l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye provoquée par la protéine étudiée.

C'est en effet parmi les diverses techniques possibles, celle qui fait appel à un organe isolé, l'iléon de Cobaye, que nous avons choisie (LABORDE et Al., 47).

A — Principe :

Lorsqu'un fragment d'iléon isolé de Cobaye est placé dans des conditions "physiologiques" (immersion dans un liquide de Tyrode oxygéné), l'addition dans le bain de doses identiques d'histamine provoque des contractions reproductibles. Une variation de la quantité d'histamine entraîne une variation proportionnelle de l'amplitude de la contraction, tout au moins dans certaines limites.

Ainsi, il est possible de réaliser une gamme d'étalonnage qui permettra de relier amplitude de la contraction et quantité d'histamine introduite.

B — Matériel — Réactifs et techniques.

1 - Matériel :

a) appareil à organe isolé

Il est constitué par une cuve de 5 ml de volume, placée dans une enceinte thermostatée à 37° C. Cette cuve est munie d'un robinet à trois voies permettant son remplissage par du liquide de Tyrode préalablement réchauffé, ou la vidange totale ou partielle dans le but de rincer l'iléon.

Le bain est oxygéné et brassé par l'arrivée de bulles d'air ou d'oxygène.

b) Enregistreur des contractions

Une jauge de contrainte est reliée à une chaîne de mesure (*).

c) Iléon isolé de Cobaye

Les cobayes utilisés sont des animaux mâles adultes, de poids moyen. Après mise à mort de l'animal, l'intestin grêle est séparé de la masse des viscères et on prélève l'iléon qui correspond à la partie terminale reliée au gros intestin. Après nettoyage par du liquide de Tyrode, l'iléon est rapidement monté dans l'appareil à organe isolé. L'équilibrage de la jauge de contrainte correspond à une tension de 2 g.

2 - Réactifs :

a) Liquide de Tyrode

Au liquide de Tyrode dilué, nous ajoutons :

glucose : $0,25 \times 10^{-3}$ g/l

sulfate d'atropine : $0,50 \times 10^{-7}$ g/l.

b) Gamme d'histamine

Solution mère à 10^{-4} M/ml de dichlorhydrate d'histamine dans de l'eau distillée et ajustée à pH 4 par de l'acide chlorhydrique. Conservation à + 4°.

Les dilutions sont ensuite faites extemporanément avec le liquide de Tyrode.

c) Echantillons à étudier

Les protéines lyophilisées sont dissoutes quelques heures avant l'emploi dans du liquide de Tyrode pour avoir une solution à 30×10^{-6} g/ml.

3 - Techniques :

On procède à une étude préliminaire des iléons pour déterminer leur sensibilité et leur meilleure zone différentielle. Deux témoins connus sont essayés : une protéine inactive et une protéine active, pour éliminer les iléons donnant des réponses aberrantes (2 p. cent).

On vérifie que la solution protéique ne possède pas d'action contracturante propre sur l'iléon. On détermine les réponses de l'iléon à la gamme d'histamine.

(*) Distribué par PHILIPS Industrie.

Pour le dosage, on alterne :

- dose d'histamine choisie (0,2 n M/ml dans le bain),
- et mélange de la même dose d'histamine avec la solution de la protéine à doser.

On continue les dosages en diluant la solution de protéine jusqu'à perception de la plus petite dose provoquant une diminution de l'activité.

4 - Résultats :

Nous portons sur une courbe en abscisse la quantité de protéine étudiée et en ordonnée le pourcentage de diminution d'activité de l'histamine.

Nous constatons que ce pourcentage se maintient à un plateau de 20 p. cent, puis, à partir d'une certaine dose de protéine, décroît avant de s'annuler.

Cette concentration x (poids de protéine par ml dans le bain au contact de l'organe), correspond à une unité d'activité, ou poids minimal de préparation qui, dissoute dans 1 ml de liquide de Tyrode dilué, au contact de l'iléon isolé de Cobaye, diminue au maximum, pour un échantillon l'activité biologique de l'histamine.

Nous pouvons ainsi chiffrer le nombre d'unités d'activité par mg (1/x) d'un échantillon, son activité globale ; et suivre soit l'enrichissement successif des fractions au cours de la préparation, soit les variations d'activité au cours des manipulations effectuées pour étudier le mode de liaison protéine-histamine.

II – DOSAGE DE L'HISTAMINE RADIOMARQUEE

Nous avons utilisé du dichlorhydrate d'histamine (*), marqué au ^{14}C sur le C en position 2 du noyau imidazole. Son activité spécifique était de 51 mC/mM.

1 - Histamine

L'ampoule contenait 50 µC (soit environ 1µ M à 2 p. cent près). Nous avons fait une solution mère par addition de 10 ml de solution à 8 p. mille de chlorure de sodium amené à pH 6. Cette solution a été divisée en échantillons de 0,5 ml, conservés au congélateur à - 18° C. Son activité est de 5 µ C/ml/100nM.

L'activité biologique de cette histamine est vérifiée par un dosage pharmacologique. Son activité physico-chimique est vérifiée par un dosage fluorimétrique.

2 - Comptage et mesure

Nous utilisons un compteur à scintillation liquide pour mesurer la radio-

(*) Radiochemical Center - Amersham-Buckinghamshire - G.B.

activité β émise.

Le mélange scintillant est de l'Insta-gel (*).

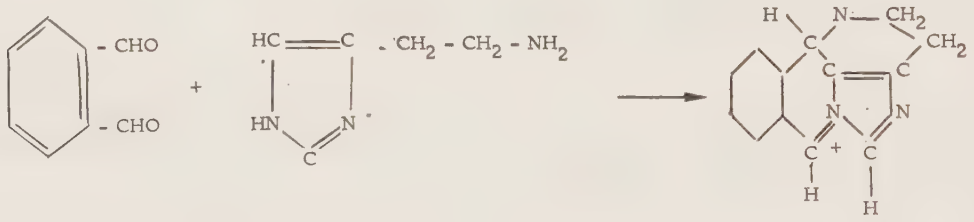
Le comptage est effectué dans un appareil PACKARD (*). Tricarb mod. 3375.

La mesure se fait après détermination du mouvement propre de chaque flacon contenant le mélange scintillant.

La détermination du rendement de comptage a été effectuée au moyen d'une solution étalon de composé ^{14}C fourni par le C.E.A. (* *).

III – DOSAGE FLUORIMETRIQUE

SHORE et Al. (87) basent leur méthode de dosage de l'histamine sur la formation d'un composé fluorescent stable par condensation avec l'orthophtaldéhyde.



Par méthode manuelle, nous appliquons directement la technique précitée.

Par la méthode à l'auto-analyseur, nous faisons appel à la technique de RUFF et Al. (80) qui implique une dialyse avant la réaction histamine-orthophtaldéhyde.

(*) Packard Instrument S.A. - 3-5, rue Broussais, PARIS XIVème.

(**) Laboratoire de Mesures - Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay.

CHAPITRE II

RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

PRINCIPE.

L'augmentation de la concentration en sel neutre d'un milieu crée une compétition pour les ions de l'eau entre la protéine et les ions salins ; l'affinité étant plus importante dans le dernier cas, la protéine tend à précipiter. La solubilité des protéines est variable, elle est définie en fonction de la concentration en sel et du pH du milieu (SCHULTZE et HEREMANS, 88).

Nous utilisons comme sel neutre le sulfate d'ammonium soit sous forme de solution saturée 4 M, soit sous forme cristallisée.

TECHNIQUE.

Nous opérons à 4°C, et nous effectuons une dilution préalable au demi des sérums pour diminuer les phénomènes de coprécipitation.

Selon le volume à traiter, le sulfate d'ammonium est ajouté sous forme de solution saturée, environ 4 M à 15° C ou sous forme de sel cristallisé. Les quantités sont données dans le premier cas pour la formule :

$$Xml = \frac{Vl\ (C2 - C1)}{4 - C2}$$

dans le second cas par la formule :

$$Yg = \frac{530 \times Vl\ (C2 - C1)}{1000\ (4 - 0{,}285\ C2)}$$

X = vol. en ml de la solution saturée en sel à ajouter,
Y = poids de sel cristallisé à ajouter en gramme,
Vl = volume en ml de solution à traiter,
C1 = concentration molaire initiale en sulfate d'ammonium de la solution à traiter,
C2 = concentration molaire en sulfate d'ammonium que l'on désire dans la solution à traiter,
530 = concentration en g/l de sulfate d'ammonium d'une solution saturée,
0,285 = volume en ml occupé par le sulfate d'ammonium dans 1 ml de solution saturée.

CHAPITRE III

EXTRAIT PHYTIQUE

PRINCIPE.

L'acide phytique, ou inositohexaphosphorique,a pour propriété de se combiner à un grand nombre de protéines. Le précipité n'est obtenu dans de bonnes conditions que si l'on respecte certains impératifs de concentration en protéine, de normalité d'acide phytique, de force ionique et de pH. L'acide phytique, n'étant combiné que par des liaisons faibles, pourra ensuite être éliminé par dialyse.

AGNERAY (3), dans son étude systématique des protéines solubles dans l'acide phytique, a montré que le surnageant contenait des glycoprotéines parmi lesquelles le constituant majeur est l'orosomucoïde. Dans le précipité phytique, on trouve la sérumalbumine, la transferrine et les immunoglobulines.

TECHNIQUE.

Pour obtenir l'indice de combinaison phytique optimal de la sérumalbumine et des immunoglobulines, nous opérons à pH 2,10. Comme les cations sont susceptibles de gêner la précipitation, il convient de les éliminer ou de réduire leur concentration. Aussi nous prenons des précautions particulières au niveau de l'acide phytique et de l'échantillon de protéines :

- La solution d'acide phytique est préparée à partir d'une solution M/12 de phytate de sodium et passée sur échangeur Dowex 50 pour éliminer et le sodium et les autres cations venant de souillures éventuelles (magnésium ...). On ajuste le volume, après titrage par la soude, pour avoir une solution 0,1 N.
- L'échantillon de proteines est obtenu par relargage par le sulfate d'ammonium. Aussi la dialyse est-elle particulièrement surveillée.

La technique suivie est celle choisie par AGNERAY (3). La solution de proteines à environ 50 g/l est diluée par 3 volumes d'eau distillée, amenée à pH 2,10 et précipitée par 6 volumes d'une solution 0,1 N d'acide phytique.

Après quelques minutes, on vérifie le pH d'une partie aliquote du surnageant de centrifugation et la non précipitation par addition de solution d'acide phytique.

Après quelques heures de contact, surnageant et précipité sont séparés par centrifugation.

Le surnageant est amené à pH voisin de 5 à 6 par addition goutte à goutte de soude environ 5 N. Il est ensuite dialysé dans des boudins de cellophane contre de l'eau déminéralisée, concentré dans une enceinte ventilée ; ces opérations étant alternées jusqu'à dialyse complète et réduction du volume de l'échantillon. Celui-ci est ensuite lyophilisé.

CHAPITRE IV

FILTRATION SUR GEL

PRINCIPE

Les gels polymérisés hydrophiles qui sont utilisés pour la filtration sur gel se présentent sous forme de poudre sèche. Leur caractéristique est définie par la quantité de liquide qu'ils absorbent au cours du gonflement préalable à leur utilisation. Ils forment alors un gel permettant une séparation basée sur la notion d'espace de diffusion : les plus petites molécules pénètrent à l'intérieur des mailles du gel, ont plus d'espace à parcourir et sont donc éluées plus tardivement que les grosses molécules exclues du gel. Ce type de chromatographie permet une séparation des molécules en fonction du volume qu'elles occupent, à moins que des phénomènes d'adsorption sur le gel, ne viennent retenir certaines d'entre elles.

Nous disposons dans le commerce de deux sortes de gels :

- le Séphadex (*), dont le degré de réticulation est fonction du nombre de ponts glycéryles obtenus par condensation d'épichlorhydrine avec du dextrane en milieu alcalin ;
- le Biogel (**), obtenu par condensation d'amide acrylique avec le N-N' méthylène-bis-acrylamide. Dans ce cas, la dimension des mailles dépend de la concentration totale en monomère et du pourcentage de monomère bifonctionnel.

TECHNIQUE

Nous utilisons des colonnes délimitées à chaque extrêmité par un piston muni d'un filtre.

Nous calculons une quantité de gel légèrement supérieure à celle qui, après gonflement, est nécessaire pour remplir la colonne. Nous faisons gonfler le gel dans environ trois fois le volume du liquide d'élution de la chromatographie, nous agitons quelques heures, décantons, renouvelons le liquide, agitons à nouveau et utilisons la suspension formée.

(*) Séphadex commercialisé par PHARMACIA UPSALA SUEDE et distribué par JARRE-JACQUIN, 18, rue Pierre Curie, PARIS Vème.

(**) Biogel commercialisé par BIO-RAD et distribué par TOUZART et MATIGNON, 3, rue Amyot PARIS Vème.

Pour son remplissage, la colonne, fermée par un piston à la partie inférieure, est munie à sa partie supérieure d'une allonge permettant le remplissage de la colonne en une seule opération. Après décantation du gel, l'allonge est enlevée, la colonne est fermée par le second piston, puis tassée par circulation de tampon dont le réservoir est un vase de Mariotte afin de maintenir constante la pression hydrostatique (différence de hauteur entre l'ajustage de sortie et le niveau d'entrée d'air).

Nous avons toujours réalisé nos expériences de chromatographie en phase ascendante.

CHAPITRE V

DIAFILTRATION – ULTRAFILTRATION

L'apparition sur le marché de membranes de polymères anisotropiques de grande résistance mécanique, à pores de taille fine et déterminée, a permis le développement des techniques d'ultrafiltration et de diafiltration, procédés dynamiques de filtration basés sur la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Cette technique peut être appliquée soit pour purifier et fractionner un mélange de constituants, soit pour étudier le mode de liaison entre petites et grosses molécules.

I – LES MEMBRANES

Les membranes (*) anisotropiques que nous utilisons ne sont pas cellulosiques. Elles sont constituées de deux couches.

La première, mince (0,1 à 1,5 μ), constitue un film superficiel de pores de taille variant selon le type de membrane entre 2 et 100 Å et réalise la séparation moléculaire. La seconde, sous-jacente, beaucoup plus épaisse (50 à 250 μ), forme une assise spongieuse à larges pores, n'oppose qu'une très faible résistance au solvant, et n'a qu'un rôle mécanique de support.

Les membranes se définissent par :

- le polymère de constitution : UM, PM, XM ;
- leur porosité qui conditionne le seuil d'exclusion théorique des molécules. Mais les indications données ne sont valables que pour des molécules sphériques, en solutions pures et ne tiennent pas compte de phénomènes secondaires.

II – CELLULES DE FILTRATION

Les cellules de filtration AMICON existent en tailles très variables : 10 - 65 - 200 - 400 et 2 000 ml.

(*) DIAFLO, commercialisé par AMICON et distribué par MECAVIGOR, 88, rue de la Folie-Méricourt - PARIS.

Elles sont constituées par une chambre de la contenance précédente. A la partie supérieure se trouve un couvercle muni d'un dispositif permettant l'arrivée soit de l'azote destiné à maintenir la pression désirée, soit de liquide d'alimentation sous cette même pression, et d'une valve permettant en fin d'opération de ramener la pression à la pression atmosphérique. Au couvercle est suspendu un barreau magnétique de longueur juste suffisante pour permettre d'agiter le milieu sans dégrader la membrane. (Fig. 4).

A la partie inférieure, se trouve la membrane qui délimite un espace sous-membranaire muni d'un système d'évacuation du soluté filtré.

III — AVANTAGES ET INCONVENIENTS

La nature non cellulosique des membranes explique leur résistance à la température (on peut opérer à + 4° C ou à température plus élevée), aux variations de pH, aux agents chimiques (les résistances de chaque type de membrane sont précisées par le constructeur) et à la pression.

Cependant, ces membranes ne se comportent pas comme étant parfaitement inertes. Il apparaît des charges électrostatiques, favorisées peut-être par l'existence du champ magnétique créé par le système d'agitation que nous employons. On peut observer des phénomènes d'attraction ou au contraire de rejet de certaines molécules. On remarque qu'au cours de la filtration, les molécules tendent à s'accumuler à la surface de la membrane et à former un gel entraînant une diminution de débit pouvant aller jusqu'au colmatage complet. Pour diminuer ce phénomène, on opère en solutions diluées (concentration en proteines inférieure à 1 p. cent), on utilise une faible pression de travail (inférieure ou égale à 0,7 Bar), on agite le milieu de manière régulière.

IV — APPLICATIONS

A — Définition de l'ultrafiltration et de la diafiltration

Après introduction dans la chambre d'un échantillon, application de la pression recommandée et mise en route de l'agitation, on réalise une ultrafiltration qui permet de concentrer de grosses molécules qui sont retenues théoriquement en fonction du seuil d'arrêt au-dessus de la membrane. Mais celle-ci fonctionne comme une membrane de dialyse, aussi y aura-t-il toujours un équilibre entre les concentrations des petites molécules de part et d'autre de la membrane. Pour déplacer cet équilibre, il est nécessaire de réaliser un apport de solvant : c'est le principe de la diafiltration, pendant laquelle le volume de la chambre reste fixe en cours d'expérience.

La diafiltration elle-même peut faire appel à deux sortes de techniques (BLATT et Al., 9) :

1 - Technique dite du "Wash Out"

On veut éliminer d'une solution les petites molécules que laisse passer la

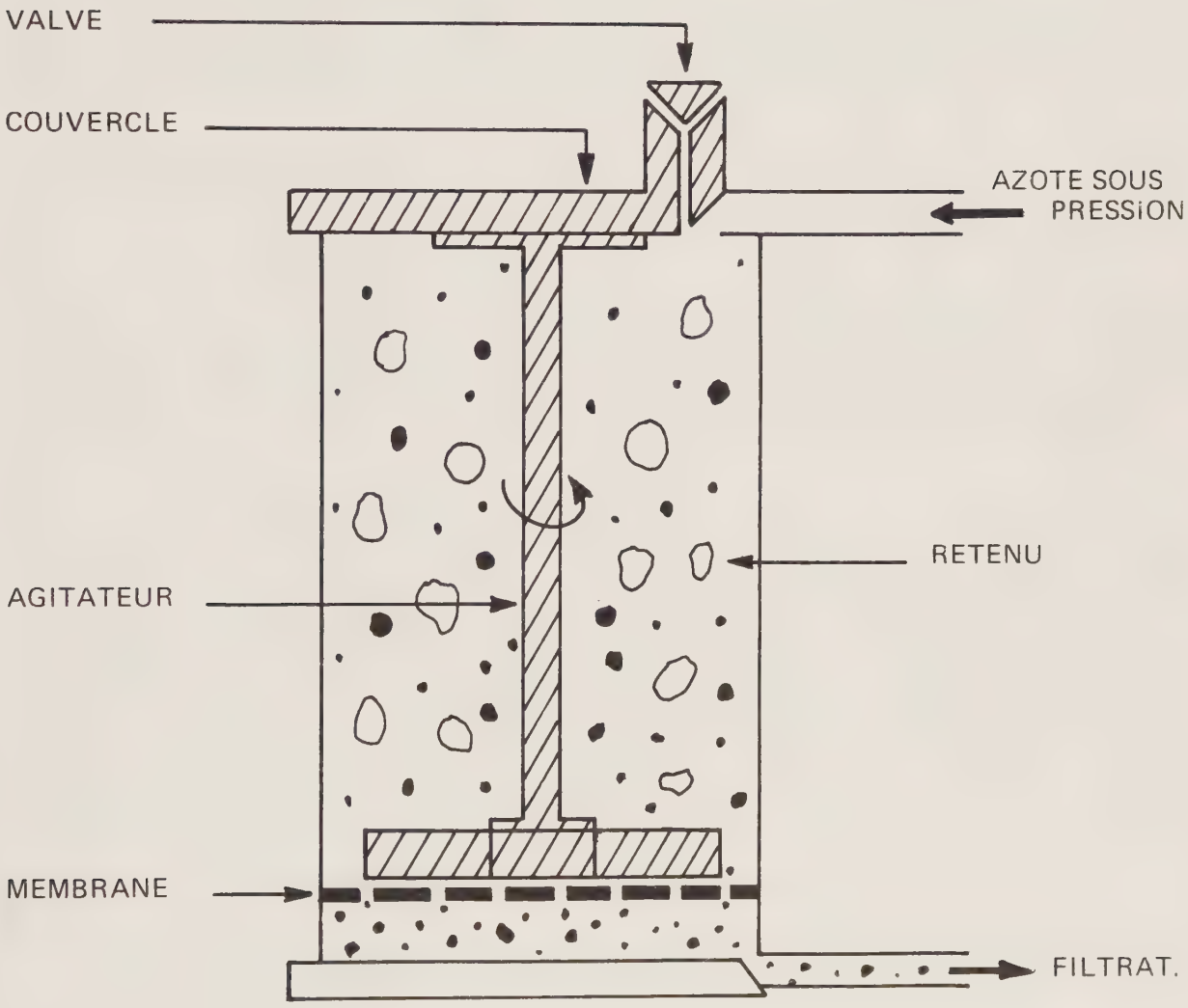


Figure 4

SCHEMA D'UNE CELLULE D'ULTRA FILTRATION MOLECULAIRE

membrane choisie, et en retenir les grosses molécules de taille supérieure au seuil d'arrêt de la membrane. La solution contenant la petite molécule est mise dans la cellule de filtration, le liquide de lavage est mis dans le réservoir. Cette technique est surtout utilisée dans un but de purification, de dessalage, au même titre que la dialyse classique, mais en présentant sur cette méthode l'avantage d'être beaucoup plus rapide. Cette technique peut aussi servir à l'étude des phénomènes de liaison entre petites et grosses molécules.

2 - Technique dite du "Wash In"

On introduit la solution contenant la grosse molécule dans la cellule de filtration et celle renfermant la petite molécule dans le réservoir. Cette technique permet l'étude des phénomènes de liaison entre petites et grosses molécules.

B — Méthodologie de la diafiltration

1 - Préparation de la membrane

Les membranes sont délivrées sous forme sèche. Elles sont recouvertes d'un mince film de plastifiant à la glycérine que l'on élimine par trempage dans l'eau. Pour l'utilisation on place la face brillante de la membrane au contact de la solution à diafiltrer. Après emploi, les membranes sont conservées au froid dans de l'éthanol à 10 volumes.

2 - Mise en route de l'appareillage

La solution à diafiltrer doit avoir une concentration en protéines inférieure ou égale à 1 p. cent. Elle est placée dans la chambre à diafiltrer de dimension convenable et munie de la membrane choisie. Un agitateur magnétique ne chauffant pas en cours de fonctionnement, est placé sous la chambre. La chambre réservoir est remplie du liquide de lavage puis reliée d'une part à la cellule de filtration, d'autre part à une source d'azote qui permet d'appliquer la pression préconisée par le fabricant pour la membrane choisie. Rapidement et successivement, on applique cette pression au réservoir, on ferme la valve de sécurité de la cellule destinée à éviter toute surpression non voulue, et on ouvre la valve de connection entre réservoir et cellule. Il ne doit y avoir qu'une variation insensible de volume dans la cellule de filtration.

Le filtrat est recueilli sur collecteur de fractions si nécessaire.

3 - Etude de la perméabilité de la membrane et des caractéristiques de l'installation

Pour étudier l'inertie de la membrane vis-à-vis de petites molécules, on peut faire passer un volume déterminé d'une solution de cette molécule et comparer la concentration et la vitesse d'apport du liquide d'alimentation avec la concentration et la vitesse d'écoulement de l'effluent.

D'autre part, on peut faire la même étude couplée avec la détermination du volume mort de l'installation en mesurant le temps d'apparition de la petite molécule, en admettant que la membrane et la petite molécule n'aient aucune interaction

C — Etude théorique

(1) - Absence d'interaction Petite molécule - Membrane

Prenons une cellule remplie d'une solution d'une petite molécule, sel ou colorant, et admettons que nous nous trouvions dans des conditions idéales, c'est-à-dire de bonne agitation de la cellule, de non variation de volume dans la cellule et d'inertie totale de la membrane vis-à-vis de la petite molécule. On peut alors dire que la concentration de la petite molécule dans l'éluat est une fonction logarithmique du volume total filtré.

= Dans les expériences de "Wash Out" :

$$\text{Ln } \frac{Co}{C} = \frac{V - V'}{\overline{Vo}} \qquad (1)$$

Co = concentration initiale dans la cellule ;
C = concentration dans l'effluent ;
V = volume total filtré au moment de la mesure ;
V' = volume mort de l'installation ;
$\overline{Vo}$ = volume moyen de la cellule (est égal au volume initial en début d'expérience).

= Dans les expériences de "Wash-In" :

$$\text{Ln} = \frac{Cf}{Cf - C} = \frac{V - V'}{\overline{Vo}} \qquad (2)$$

où le nouveau paramètre Cf est la concentration de la petite molécule dans le réservoir d'alimentation.

Transformons les logarithmes népériens en logarithmes décimaux, les équations (1) et (2) deviennent respectivement :

(3) $$\log 10 \frac{Co}{C} = \frac{1}{2,3} \times \frac{V - V'}{\overline{Vo}}$$

ou (4) $$\log 10 \frac{Cf}{Cf - C} = \frac{1}{2,3 \times \overline{Vo}} \times V - \frac{V'}{2,3 \times \overline{Vo}}$$

Nous avons ainsi une équation de la forme $y = ax - b$.

La droite représentative de cette fonction coupera (voir figure 5, page 43) :

- l'axe des ordonnées en un point B d'ordonnée

$$y(B) = - \frac{V'}{2,3 \times Vo}$$

- l'axe des abscisses en un point C d'ordonnée :

$$x(C) = - \frac{b}{a} = V'$$

La pente (a) de cette droite sera :

$$a = \frac{1}{2,3 \times \overline{Vo}}$$

(1) $\log \frac{Co}{C}$

(2) $\log \frac{Cf}{Cf - c}$

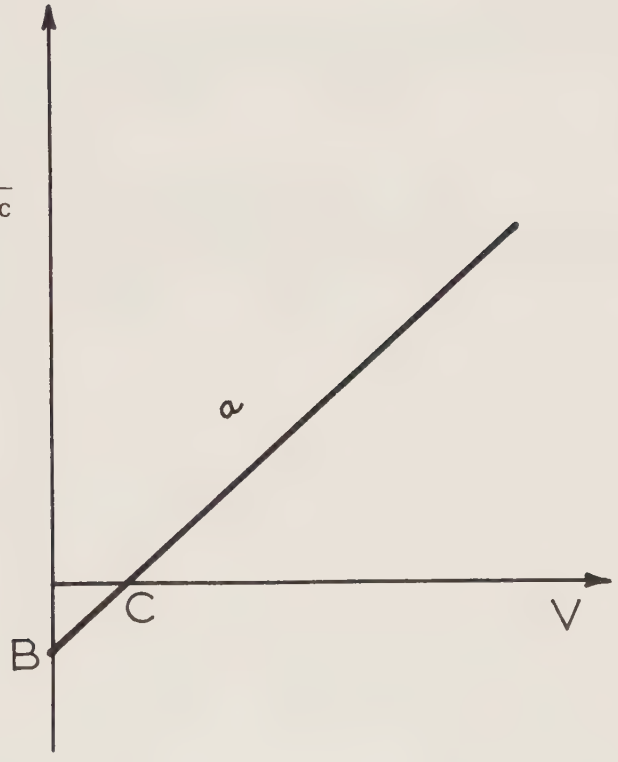


Figure 5

Expression de la diafiltration

d'où l'on peut déduire :

$$\bar{V}o = \frac{1}{2,3 \times a}$$

Sur le plan expérimental, il faut :

- avoir le plus petit volume mort (V') possible entre la membrane et le collecteur de façon à augmenter la précision de l'analyse mathématique,
- choisir la membrane de façon à retenir totalement la grosse molécule, laisser filtrer entièrement la petite molécule.

Cependant, des phénomènes secondaires peuvent intervenir. Nous allons examiner ce que deviennent alors les paramètres définis précédemment, dans deux cas précis :

= Rétention de la petite molécule par la membrane,
= Liaison de la petite molécule à la membrane.

(2) - Rétention de la petite molécule par la membrane :

- Si nous appelons σ le coefficient de rétention, pour une molécule totalement retenue, $\sigma = 1$; pour une molécule non retenue $\sigma = 0$.

Nous pouvons dire :

$$\sigma = 1 - \left(\frac{C}{C'}\right)$$

- Les équations (3) et (4) voient la partie droite changer, et deviennent respectivement :

(5) $$\log \frac{Co}{C} = \frac{1}{2,3} \times \frac{(V - V')(1 - \sigma)}{\bar{V}o}$$

(6) $$\log \frac{Cf}{Cf - C} = \frac{1 - \sigma}{2,3 \times \bar{V}o} \times V - \frac{(1 - \sigma)}{\bar{V}o} \times V'$$

- Le point C a pour ordonnée :

$$x\,(C) = -\frac{b}{a} = V'$$

c'est-à-dire que le volume mort reste le même que dans le cas précédemment examiné (C 1).

- La pente a de la droite devient :

$$a = \frac{1 - T}{2,3 \times \bar{V}o}$$ et diminue par rapport à (A).

On en déduit que :

$$Vo = \frac{1 - T}{2,3 \times a}$$

donc le volume de la cellule change, diminue par rapport à (C1).

- Le point B a pour ordonnée :

$$yB = \frac{(1 - T)\ V'}{2,3 \times Vo}$$

c'est-à-dire que la droite coupera l'axe des y plus près du point O, ce qui est normal puisque la pente de la droite est plus faible.

- Une autre conséquence sera, dans l'expérience de "wash out", de nécessiter un volume de liquide supérieur à celui des conditions en (C1) pour diminuer de la même manière la concentration dans la cellule de la petite molécule.

(3) - Liaison de la petite molécule à la membrane

Il se produit un retard apparent à la diafiltration comme dans (C2).

Mais si l'on fait varier la surface de la membrane exposée à la solution tout en gardant un volume constant, on verra le phénomène s'aggraver, se différenciant en cela de (C2).

(4) - Liaison saturante de la membrane

Ceci se produit lorsque la membrane se sature, en particulier, pour des valeurs basses de C.

La conséquence en sera une augmentation apparente du volume mort V', mais, après que la membrane se sera saturée, la diafiltration obéira aux lois de (1) et de (2).

En conclusion, on essaiera de pallier :

- les rétentions, par le choix d'une membrane à seuil de rejet approprié ;
- les liaisons à la membrane, en diminuant le rapport du volume de l'échantillon à la surface de la membrane, ou en augmentant la concentration de la petite molécule (le phénomène est surtout sensible à faibles concentrations en petite molécule).

Malheureusement, ceci est en contradiction avec d'autres impératifs. En particulier, le fait que la polarisation de la membrane est moindre en présence de faibles concentrations d'échantillons.

CHAPITRE VI

CHROMATOGRAPHIE SUR CARBOXY-METHYL-CELLULOSE

La carboxy-méthyl-cellulose comporte, fixée sur un squelette inerte, des groupements carboxyliques ionisés. Ces groupements acides faibles pourront, soit fixer les groupements chargés positivement, soit au contraire repousser et laisser dans le milieu aqueux ambiant des groupements chargés négativement.

I — NATURE DE L'ECHANGEUR

La molécule de base, la cellulose, est constituée par un enchaînement de béta-glucopyranose en 1-4, ce qui laisse donc sur la molécule trois hydroxyles libres : une fonction alcool primaire en 6, et deux fonctions alcool secondaire en 2 et 3. Sur ces hydroxyles sont greffés des groupements carboxy-méthyles :

$$-O-CH_2-COO^-$$

Comme les groupements ionisés ne sont pas trop nombreux, les qualités de perméabilité et d'insolubilité de la résine sont conservées.

II — FONCTIONNEMENT DE L'ECHANGEUR

La carboxy-méthyl-cellulose est un échangeur acide faible, donc échangeur cationique.

En milieu tamponné à pH inférieur au point isoélectrique des protéines, celles-ci se comportent comme des bases, et sont donc fixées par les groupements carboxyliques de la résine. En augmentant le pH, au fur et à mesure que les protéines seront en milieu plus basique que leur point isoélectrique, celles-ci se comportent comme des acides, ne sont donc plus fixées par l'échangeur et sont éluées.

III — PREPARATION DE L'ECHANGEUR

A — Précyclage

L'état sec favorise la conservation de l'échangeur utilisé. Mais s'établissent alors de nouvelles liaisons hydrogènes qui peuvent rendre certains sites d'échanges ioniques moins accessibles aux grosses molécules.

Le précyclage,nécessaire chaque fois que l'échangeur se présente à l'état sec, aura pour but de faire gonfler les échangeurs et de libérer totalement les sites échangeurs.

Le fabricant recommande de faire les opérations successives suivantes :

- Traiter avec 15 volumes de soude 0,5 N, laisser reposer trente minutes à 1 heure sans dépasser deux heures.
  Cette opération a pour but de transformer l'échangeur en forme chargée et de provoquer un gonflement maximal.
- Filtrer, puis laver sur Buchner jusqu'à ce que l'effluent atteigne le pH intermédiaire de 8.
- Agiter dans 15 volumes d'acide chlorhydrique 0,5 N. Ceci a pour but de transformer l'échangeur en forme acide plus facile à équilibrer.
- Filtrer, puis laver jusqu'à obtention d'un effluent neutre.

B — Equilibrage

L'équilibrage avec un tampon a pour but d'établir le pH cherché pour le début de l'expérience. On le réalise par agitation de l'échangeur dans le premier tampon à utiliser. On laisse décanter, on élimine le surnageant et on renouvelle l'opération jusqu'à ce que le surnageant ait exactement le même pH que le tampon. Par sécurité, on effectue un ou deux lavages supplémentaires.

C — Elimination des particules fines

Les échangeurs commercialisés couramment n'ont pas une dimension de grain homogène, car pour améliorer l'homogénéité de la granulométrie, il faudrait appliquer des procédés de fabrication et de tamisage entraînant une élévation considérable du prix de revient. Les échangeurs, tels qu'ils sont fournis par le fabricant, comportent en particulier des "fines", c'est-à-dire des petites particules dont le diamètre est de l'ordre de 5 à 10 microns. Ces fines ont pour effet de colmater les filtres inférieurs des colonnes, de ralentir ou même d'arrêter totalement le débit des chromatographies, de perturber les performances chromatographiques en empêchant l'uniformité de remplissage des colonnes.

Pour réaliser leur élimination, on met l'échangeur en suspension dans le tampon. On verse l'ensemble dans une éprouvette et on mesure la hauteur de la suspension. On laisse équilibrer pendant quelques minutes, puis on aspire à la trompe à vide 80 p. cent environ du tampon qui se trouve au-dessus de l'échangeur tassé. On ajoute du tampon en volume égal à la moitié du volume de l'échangeur. Celui-ci est maintenu prêt à l'emploi.

Cette élimination des particules fines est nécessaire chaque fois que l'on monte une nouvelle colonne de chromatographie.

D — Montage de la colonne

Les particules de l'échangeur ont des diamètres hétérogènes. Lors d'un remplissage par simple décantation d'une colonne, il s'établit une classification granulométrique

des particules selon un gradient de dimension allant des plus grosses particules en bas au plus fines en haut. Si ce gradient était uniforme, il ne serait pas très gênant pour les résultats de la chromatographie, à moins que le débit de la colonne ne soit trop diminué. Mais il faut craindre que des courants de convection ne se forment dans la suspension en voie de décantation, courants facilités par une source de chaleur. Cette mauvaise répartition a pour résultat de modifier le profil d'élution des tampons.

On pallie ces inconvénients en établissant dès le début du remplissage de la colonne un débit de tampon le plus rapide possible, au moins égal à celui utilisé plus tard pour l'élution. Le remplissage de la colonne se fait par aliquotes correspondant à une hauteur d'échangeur tassé d'environ 7 cm. Lorsque la colonne est remplie, on la ferme par un piston à son extrêmité supérieure et l'on fait passer par pompage positif de 10 à 20 ml/heure/cm2 un volume de tampon au moins équivalent à celui de la colonne, plus important si possible de manière à parfaire l'équilibrage.

E — Réactifs

- Tampon Acéto-Acétique pH 4,2 - 0,1 M
- Tampon Acéto-Acétique pH 4,5 - 0,1 M
- Tampon Acéto-Acétique pH 5,5 - 0,1 M
- Na Cl 1 M ajusté pH 7
- Na OH 0,025 N.

F — Echantillon

On dissout la fraction protéique dans du tampon pH 4,2 - 0,1 M à une concentration voisine de 2,5 p. cent, la solution obtenue est mise en dialyse environ 48 heures contre le tampon pH 4,2 - 0,1 M, c'est-à-dire le tampon d'équilibrage de l'échangeur.

Après centrifugation, l'échantillon peut être appliqué sur la colonne.

IV — TECHNIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE

A — Application de l'échantillon

Il est préférable que la colonne soit fermée à sa partie supérieure par un piston muni au mieux d'un disque poreux, ou à défaut d'un filtre de façon à ce que l'échantillon se répartisse uniformément sur le sommet de la colonne.

Avant de commencer la chromatographie de l'échantillon, on peut vérifier l'homogénéité du tassement de la colonne par passage d'un échantillon de colorant acide comme l'Orangé II.

Puis on applique l'échantillon, de préférence à l'aide de la pompe et avec un débit égal à celui que l'on utilisera pour l'élution.

B — Elution :

Nous avons choisi la méthode d'élution échelonnée, c'est-à-dire que l'élution est réalisée par plusieurs tampons utilisés selon un pH croissant.

Le pH du tampon est choisi de manière à se rapprocher le plus possible du point isoélectrique de la protéine recherchée afin de limiter les dénaturations.

Le débit d'élution choisi est de l'ordre de 15 ml/heure/cm2.

L'effluent est suivi par lecture à 280 nm, recueilli sur collecteur de fraction. Les échantillons fractionnés sont, après regroupement, dialysés contre de l'eau déminéralisée, et lyophilisés.

V — REGENERATION ET CONSERVATION DE L'ECHANGEUR

Le dernier liquide d'élution est de la soude 0,025 N. On sort l'échangeur de la colonne et on le lave plusieurs fois dans cette solution. Puis on amène le surnageant de décantation à pH 7 avec de l'acide chlorhydrique 0,025 N ; on procède ensuite à plusieurs lavages dans le tampon d'équilibrage, jusqu'à ce que les conditions nécessaires pour pouvoir recommencer une nouvelle chromatographie soient remplies.

Si l'on ne recommence pas immédiatement une expérience, on évite de laisser l'échangeur au contact des électrolytes sans lui ajouter un agent de conservation.

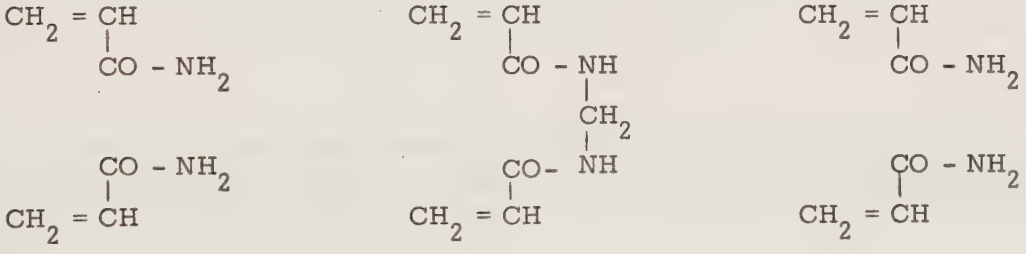
CHAPITRE VII

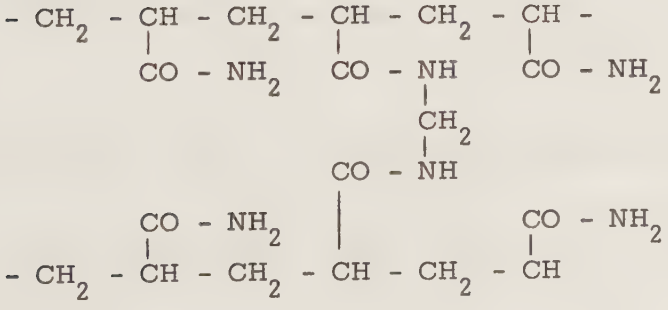
SEPARATION SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

I — DEFINITION

L'électrophorèse en gel fut décrite en 1955 par SMITHIES (92) qui prenait comme support le gel d'amidon. Si ce support a l'avantage d'avoir un bien meilleur pouvoir séparateur que les supports classiques, il présente par contre de nombreux inconvénients : mauvaise reproductibilité, présence de charges en particulier anioniques, courant d'électro-endosmose, opacité, fragilité.

De grands progrès ont pu être réalisés lorsque ORNSTEIN et DAVIS ont proposé le gel de polyacrylamide de polymères formés à partir de produits chimiques de bas pH et que l'on peut obtenir à un degré élevé de pureté. On polymérise de l'acrylamide et le NN'-méthylène-bisacrylamide en présence d'un catalyseur, persulfate d'ammonium de NNN'N' tétraméthylène diamine et souvent d'un réducteur, de la riboflavine. On obtient ainsi un réseau à trois dimensions :





Le gel obtenu présente l'avantage d'être thermostable, transparent, résistant, relativement inerte chimiquement, non ionique, sans courant pratiquement d'électro-endosmose et pouvant avoir des diamètres de pores très variables ajustables en fonction de la concentration en monomère.

II — SEPARATION EN TUBES

A — Principe :

Le pouvoir de séparation repose sur un double principe :

- séparation par électrophorèse,
- et effet de tamisage des molécules.

Les forces de friction dépendent du rapport entre la dimension de la molécule et le diamètre des pores du gel.

Quand le diamètre apparent de la molécule est petit par rapport à celui des pores du gel, la résistance au freinage est faible ; quand le diamètre est voisin de celui des pores, elle devient pratiquement infinie. Or, pour un gel de 7,5 p. cent, le diamètre des pores est d'environ 50 A°, et l'on connait le diamètre et la longueur de la plupart des protéines.

Pour séparer les molécules, on peut jouer sur deux paramètres :

- la porosité du gel,
- le tampon dont l'ajustage du pH permet de modifier la charge des molécules à séparer.

B — Technique :

Nous suivons une technique simplifiée par rapport à celle proposée par ORNSTEIN et DAVIS. Nous n'utilisons qu'une sorte de gel : à 7,5 p. cent, en tampon pH 8,7 à 8,9 en polyacrylamide qui sert à la séparation et remplit le tube de migration.

Pour la composition du tampon, nous utilisons de la glycine et du Tris. La glycine, dont le pH est de 6, a une mobilité inférieure à celle des protéines les plus lentes. Le Tris est un tampon satisfaisant et non agressif vis-à-vis des protéines.

C — Matériel :

- appareillage Canalco - Disc Electrophoresis Modèle 1200 Bath (12 tubes)
- redresseur Desaga.

D - Formule des réactifs :

1 - Tampon : pH 8,5
Tris 3 g.

Glycine 14,4 g.
Eau distillée : q.s.p. 100 ml.
A diluer au 1/10 au moment de l'emploi.

2 - Solutions pour le gel de polyacrylamide :

(a) - Acrylamide 30 g
NN' méthylène bisacrylamide 0,8 g
Eau distillée q.s.p. 100 ml.

(b) - β diméthylaminopropionitrile 2,4 ml.
dans 100 ml de la solution concentrée de tampon diluée au 1/2,5.

(c) - Ferricyanure de Potassium 30 mg
Eau distillée q.s.p. 100 ml.

(d) - Persulfate d'ammonium 480 mg
Eau distillée q.s.p. 100 ml.

Ces quatre solutions peuvent être conservées un mois à + 4° C en bouteilles colorées.

3 - Colorant : Amidoschwartz à 1 p. cent dans acide acétique à 3 p. cent. ou Bleu de Comassie Gurr (*) à 1 p. cent dans acide acétique à 3 p. cent.

- Décolorant : Acide acétique à 7 p. cent

Ce réactif sert à la fois de décolorant et de fixateur des protéines.

- Echantillon : Solution de protéine dissoute dans le tampon. Son volume est en moyenne de 10 µl par tube. Sa concentration est telle que la bande la plus riche en protéine correspond à environ 300 µg de protéine.

E — Mode opératoire :

1 - Polymérisation du gel et dépôt de l'échantillon

Le nombre nécessaire de tubes est inséré verticalement dans les anneaux de caoutchouc du portoir de polymérisation recouvert d'une bande de parafilm.

La solution de gel est préparée en mélangeant des volumes égaux des solutions (a) (b) (c) (d) dans l'ordre, et en évitant de provoquer des bulles d'air par agitation trop violente. Pour huit tubes, on prend 5 ml de chaque solution donnant un volume final de 20 ml.

(*) TOUZART et MATIGNON - 3, rue Amyot - PARIS Vème.

On verse cette solution dans les tubes jusqu'à environ 5 mm. du bord supérieur du tube.

On évite le contact oxydant de l'air et on obtient une meilleure planicité de la surface supérieure du gel en déposant délicatement un petit volume d'eau distillée au-dessus du gel.

La polymérisation est obtenue en plaçant les tubes soit devant une lumière vive, soit devant une source ultraviolette pendant 1 à 2 heures.

2 - Application de l'échantillon

La petite quantité d'eau déposée au sommet du tube est éliminée. On remplit alors l'espace vide supérieur du tube avec du tampon puis, à l'aide d'une seringue, on dépose la prise d'essai délicatement à l'interface tampon-gel ; si l'on a pris la précaution d'alourdir la solution protéique par quelques cristaux de saccharose, le mélange de l'échantillon avec le tampon est plus facilement évité.

3 - Migration

On remplit le bac inférieur, correspondant à l'anode, de 200 ml de tampon. On introduit le tambour contenant les tubes, de manière que la partie inférieure de ceux-ci plonge dans le tampon. Puis on ajuste et remplit le bac supérieur, correspondant à la cathode, de 180 ml. de tampon additionné de quelques gouttes de bleu de bromophénol. Ce colorant, qui se fixe sur l'albumine, servira de témoin de migration, à condition toutefois qu'au moins l'un des huit échantillons étudiés contienne de l'albumine. Il sera de toute façon toujours indispensable de faire migrer un sérum témoin.

On place les électrodes : anode en bas, cathode en haut.

La migration dure 1 h. 30 sous une tension de 100 volts de façon à avoir une intensité de 4 à 5 mA par tube.

4 - Coloration

Les gels sont extraits des tubes de migration en les décollant des parois du tube à l'aide d'une longue aiguille de seringue. Leur coloration s'effectue en les laissant dans le bain d'amidoschwartz (ou de bleu de Comassie) pendant trente minutes.

5 - Décoloration

Par trempage dans plusieurs bains de décolorant, la décoloration est longue et incomplète. Aussi préfère-t-on éliminer l'excès de colorant par une migration en sens inverse de celle précédemment pratiquée. En opérant dans l'acide acétique à 7 p. cent, ce réactif fixe les protéines et l'excès de colorant est éliminé sans altérer la position des différentes fractions dans le gel.

A cet effet, les gels sont retournés puis introduits dans des tubes à décolo-

ration préalablement obturés à la partie inférieure par un bouchon de gel préparé comme il a été décrit précédemment.

Les deux compartiments, supérieur et inférieur, sont remplis de décolorant, les électrodes sont mises en place, une tension d'environ 300 v établie pendant environ 3 heures.

6 - Résultats

Les fractions protéiques apparaissent sous forme de fines bandes colorées. Dans le cas d'un sérum, on trouve 20 à 30 bandes.

Les gels peuvent être conservés en tubes bouchés dans de l'acide acétique à 5 p. cent.

III — SEPARATION EN GRADIENT DE CONCENTRATION EN GEL

A — Principe

L'effet de tamisage des molécules est valorisé par l'emploi d'un gel à gradient continu de concentration. Ainsi, les protéines migrent progressivement des pores les plus larges vers des pores de plus en plus petits. L'électrophorèse aide ainsi la migration. Mais la séparation terminée, les molécules se trouvent arrêtées au niveau des pores dont la taille correspond à leur dimension moléculaire.

SLATER (90, 91) proposa le premier ce procédé de meilleure résolution dans la séparation des protéines. Il faisait polymériser, entre deux plaques de verre, un gel de polyacrylamide dont la concentration suivait une progression linéaire entre 5 et 20 p. cent.

MARGOLIS et KENRICK (56) utilisent une concentration de gel croissant de 4 à 20 p. cent ou de 4 à 24 p. cent et décrivent un procédé de préparation du gradient de concentration de gel. Leur appareillage de migration est très proche de celui que nous utilisons et que l'on trouve dans le commerce. Le gel est polymérisé entre deux plaques de verre, entre lesquelles il est maintenu pendant la durée de la migration qui se fait dans le sens vertical.

B — Matériel :

1 - Plaques de gel

Nous utilisons des plaques de gel dont le gradient continu de concentration va de 4 à 24 p. cent, elles sont délivrées toutes prêtes dans le commerce (*). Le gel est emprisonné entre deux plaques de verre garantissant une épaisseur uniforme de 3 mm. Leur

---

(*) Commercialisé par LABO-MODERNE - 37, rue Dombasle, PARIS XVème.

dimension est de 70 x 70 mm. Elles sont limitées latéralement par de petites baguettes de verre maintenues par de l'adhésif. Chaque place est accompagnée d'un graphique donnant la concentration du gel en fonction de la longueur de la plaque.

2 - Appareillage de migration :

Il comprend :

= une unité d'électrophorèse constituée :

- d'un compartiment supérieur contenant le gel et les électrodes,
- et d'une partie inférieure avec un système de refroidissement en relation avec l'enceinte d'échanges,

= un bain de refroidissement dans lequel est suspendue l'enceinte d'échange de chaleur. On le remplit, soit d'eau à température voulue, soit de glace. Quand nécessaire, la circulation est assurée par une pompe ;

= une unité de décoloration.

C — Réactifs :

= tampon = Tris Borate EDTA disodique de pH 8,3

Tris	10,75 g
EDTA disodique	0,93 g
Acide borique	5,04 g
Eau distillée q.s.p.	100 ml.

= colorant :

Amidoschwartz à 0,3 p. cent dans le mélange acide acétique-méthanol-eau (1-3-6).

= décolorant :

Acide acétique à 5 ou 7 p. cent avec ou sans méthanol.

= échantillon :

Solution de protéine dissoute dans le tampon.
Le volume de dépôt est de 10 µl à 30 µl.
Le sérum est déposé sans dilution.
Les concentrations des fractions sériques sont ajustées pour ne pas avoir en moyenne plus de 300 µg de protéine par bande. La sensibilité de la méthode permet de détecter des quantités de protéines très inférieures.

Il est préférable de prendre la précaution de centrifuger l'échantillon afin que des particules non dissoutes ne puissent pas venir obstruer les pores du gel.

D — Mode opératoire :

1 - Dépôt de l'échantillon :

On insère le répartiteur dans l'espace vide au-dessus du gel du côté de la

plus faible concentration jusqu'à toucher légèrement la surface du gel et avoir un contact suffisamment intime pour obstruer chacune des quatorze cavités du répartiteur.

Le gel étant maintenu en position verticale, on introduit à l'aide d'une seringue une faible quantité de tampon (environ 10 µ l) dans chaque orifice. Puis, on dépose à l'aide d'une seringue la prise d'essai à l'interface gel-tampon ; pour éviter toute dilution avec le tampon, l'échantillon peut être légèrement alourdi par quelques cristaux de saccharose.

Parmi les échantillons migrant parallèlement, il faut prévoir la migration d'un mélange de protéines de poids moléculaire connu.

Il vaut mieux ne pas déposer d'échantillons dans les compartiments extrêmes trop sujets aux effets de bords.

Pour pallier les inconvénients des phénomènes de diffusion latérale, il est préférable de laisser un espace vide entre chacun des échantillons.

2 - Migration électrophorétique :

Les plaques portant le gel sont insérées dans le porte-gel de la cellule d'électrophorèse au niveau du compartiment de l'électrode supérieure. Le joint de caoutchouc aura été préalablement enduit de silicone de manière à assurer une parfaite étanchéité et éviter l'infiltration de tampon du compartiment inférieur dans le système contenant les électrodes. La cellule d'électrophorèse est introduite dans le bac jusqu'à environ 1 cm. du bord supérieur du gel.

L'enceinte échangeuse de chaleur est remplie de tampon puis placée dans la cuve de refroidissement elle-même connectée d'un côté à la pompe et de l'autre côté à la cellule d'électrophorèse. Le débit de la poche échangeuse est réglé par une pince de Mohr.

Les deux bacs de l'unité de migration sont largement remplis de tampon (aux deux tiers de la hauteur).

On établit alors une tension de 100 volts pendant 16 heures. L'intensité de 20 à 30 mA au début de la migration tombe de 10 ou 15 mA après deux à trois heures de migration.

3 - Coloration :

Après la migration, on sort le compartiment contenant le gel, on détache les rubans adhésifs latéraux, on enlève les baguettes de verre limitant latéralement le gel. Celui-ci est libéré d'entre les plaques de verre par immersion dans de l'eau glycérinée.

On repère la position du premier échantillon déposé en coupant, par exemple, le coin correspondant du gel. La partie inférieure la plus concentrée en acrylamide se distingue par sa consistance beaucoup plus dure de la partie supérieure moins concentrée.

Le gel est alors mis verticalement entre deux grilles métalliques, le gel le

plus concentré à la partie inférieure ; puis on laisse l'ensemble dans la cuve prévue pour la coloration pendant trois heures.

4 - Décoloration :

La décoloration est beaucoup plus efficace par élimination électrophorétique de l'excès de colorant. Toujours maintenu entre les deux grilles, le gel est placé verticalement dans le compartiment de la cellule de décoloration contenant les électrodes.

L'autre compartiment est rempli de boulettes de laine qui adsorbent le colorant. La même pompe que celle employée lors de la migration, assure le brassage de l'ensemble.

Les électrodes sont reliées à un petit générateur 12 v de courant continu, pendant environ 6 heures, jusqu'à ce que le fond du gel soit décoloré.

E — Résultats

On reporte sur un papier semi-logarithmique, en ordonnée (coordonnées logarithmiques) les poids moléculaires, et en abscisse les distances en mm depuis la zone de départ jusqu'au front de migration, ce qui correspond au niveau des pores dont la dimension a retenu le composé protéique.

L'étalonnage avec un échantillon d'albumine purissime (Behring) permet ainsi d'avoir pour points de repère au niveau du poids moléculaire 69 000, le monomère, puis les polymères successifs 138 000, 207.000, 276.000, 345.000, 414.000.

En se reportant à la courbe et en prenant comme donnée la distance de migration de l'échantillon protéique étudié, on peut déterminer son poids moléculaire.

CHAPITRE VIII

IMMUNOELECTROPHORESE QUANTITATIVE

Depuis quelques années, les biochimistes font appel à l'immunochimie qui est basée sur la spécificité de la réaction antigène anticorps pour mettre en évidence la présence de telle ou telle protéine dans un mélange complexe.

Mais la méthode classique, telle que proposée par GRABAR et WILLIAMS (32) n'est que qualitative, ou ne donne que des indications relatives sur le sens de variation. Des méthodes de précipitation en tube ont été proposées par HEIDELBERGER et KENDALL (39), mais elles exigent des quantités importantes d'antigènes et anticorps, et de plus, les résultats ne sont pas très précis. Des techniques d'immunodiffusion radiale permettent une meilleure approche quantitative (MANCINI et Al., 55).

Nous préférons utiliser la méthode d'électro-immuno-diffusion qui couple deux phénomènes :

- migration électrophorétique des protéines à pH 8,6 dans un gel d'agarose,
- et formation d'un complexe insoluble entre une protéine antigène et l'anticorps spécifique correspondant incorporé au gel (LAURELL, 50 - KRØLL, 45).

Au cours de sa migration, l'antigène rencontre l'anticorps correspondant. L'ensemble forme une sorte de fusée au centre de laquelle le complexe antigène-anticorps se resolubilise au fur et à mesure que la migration amène davantage d'antigène. A la frontière où il n'y a plus d'antigène libre, le précipité se forme. Il en résulte un appauvrissement progressif en antigène. Au point d'équilibre et au moment où l'antigène ne migre plus, se place le sommet du pic de migration dont la hauteur est proportionnelle à la quantité de protéine considérée.

L'étalonnage est effectué soit par rapport à des pools de sérums dont la composition en protéine étudiée est connue, soit par rapport à des solutions de protéine pure. Nous préférons toutefois utiliser, quand les échantillons correspondants sont disponibles dans le commerce, les deux modes d'étalonnage pour pallier le fait que les protéines semblent migrer différemment en solution pure et dans un mélange (MIESCH et Al., 58).

I — MATERIEL ET TECHNIQUES

A - Matériel :

1.- Un appareil à électrophorèse, qui comprend deux bacs à tampon, deux électrodes en platine, un support en plexiglass pouvant supporter deux plaques de verre (100 x 100 mm) et dans lequel est placé un serpentin permettant la circulation d'eau de refroidissement (*).

2.- Alimentation stabilisée (**).

3.- Voltmètre relié à deux électrodes distantes de 4 cm, afin de vérifier le voltage dans le gel même.

4.- Un emporte-pièce permettant de faire des trous de 3 mm. de diamètre.

5.- Un gabarit permettant de faire avec l'emporte pièce 18 trous équidistants dans une plaque de 100 mm.

B - Réactifs :

(1) - Tampon de pH 8,6

Véronal sodique	4,2 g
Véronal	8 g
Eau distillée	10 ml

(2) - Solution d'agarose à 1 p. cent dans le tampon obtenue par dissolution à 100° C d'agarose de l'Industrie Biologique Française. La conservation du gel est assurée à + 4° C en présence de 1 p. mille d'azide de sodium.

(3) - Antisérum de Lapin.

Antialbumine humaine (Behringwerte - Allemagne).
Antialbumine procine (Nordic-Danemark, distribué par Sebra)

(4) - Sérums-étalons : Behringwerke (Allemagne),
Albumine humaine Behringwerke (Allemagne),
Albumine porcine Nordic Danemark distribué par Sebia

(5) - Colorant

Bleu brillant de Comassie Gurr (**)	5 g
Acide acétique	100 ml
Ethanol 96°	450 ml
Eau distillée	450 ml

(*) Commercialisé par DANSK (Copenhague).

(**) DESAGA commercialisé par ROUCAIRE - 78, Av. de l'Europe - 78 - VELIZY.

On dissout le colorant dans l'acide acétique puis on ajoute l'éthanol et l'eau ; on filtre la solution après 24 heures de contact.

(6) - Décolorant :

Ethanol 96°	450 ml
Acide acétique	100 ml
Eau distillée	450 ml

C - Technique :

1) - Préparation de la plaque de gel :

On fait fondre à l'ébullition l'agarose. Pour une plaque, il faut préparer 15 ml de solution de gel, que l'on maintient à 50° C, on ajoute la quantité voulue d'anticorps. Puis on coule sur une plaque de 100 mm x 100 mm maintenue parfaitement plane. On obtient ainsi un gel de 1,5 mm d'épaisseur.

Après refroidissement, on pratique à l'aide d'un gabarit et d'un emporte-pièce, 15 à 18 trous équidistants. Ils ont 3 mm de diamètre chacun. On place la plaque de verre sur le bloc en plexiglass dans lequel on a établi la circulation d'eau. Le contact est établi par des bandes de papier Whatman n° 1.

On dépose la prise d'essai (3 à 5 μl) à l'aide de micropipette dans chaque trou, et sous une tension de 1 v/cm pour éviter la formation d'anneaux de diffusion autour des trous d'ensemencement.

2) - Migration

Différence de potentiel appliquée et temps de migration sont fonction des déterminations effectuées (Les conditions varient en fonction des propriétés de migration et de précipitation avec l'anticorps correspondant des protéines recherchées).

3) - Révélation

La plaque est séchée à l'aide d'un tissu de cellulose et en la maintenant sous pression pendant 15 minutes.

Puis on lave la plaque dans une solution de chlorure de sodium 0,15 M (2 fois 15 minutes) et enfin dans l'eau distillée.

La plaque recouverte d'un papier filtre est portée quelques heures à l'étuve jusqu'à séchage du gel.

La coloration est effectuée par un bain de 10 minutes dans la solution de bleu de Comassie, la décoloration par passage dans trois bains de décolorant. Les plaques sont ensuite séchées.

4) - Lecture - Etalonnage - Dosage

La lecture est effectuée en portant la plaque sur une feuille de papier millimétrée, et en mesurant la distance entre le centre du trou et l'extrémité du pic de précipitation.

On reporte sur une courbe d'étalonnage, les hauteurs de pic en ordonnée, les quantités d'étalon en abscisse.

On ne doit prendre en considération que les pics dont la hauteur se situe entre 20 et 50 mm.

CHAPITRE IX

DOSAGE DES CONSTITUANTS D'UNE GLYCOPROTEINE

I — DOSAGE DE L'AZOTE α AMINE

En présende de ninhydrine, il y a dans un premier temps décarboxylation et désamination des acides aminés, réduction de la ninhydrine avec formation d'hydrindantine et d'ammoniac.

Dans un second temps, une molécule d'hydrindantine et une molécule d'ammoniac se condensent avec une molécule de ninhydrine non réduite pour former un complexe violet pourpre (MOORE et STEIN, 62).

Les acides aminés ne réagissent pas de manière rigoureusement identique; la leucine ayant un comportement médian, cet acide aminé est pris comme étalon.

II — DOSAGE DES HEXOSES

De nombreuses causes d'erreur expliquent les multiples dosages proposés. Presque tous reposent sur la dégradation des oses en milieu acide puis la condensation des produits obtenus avec divers composés.

Nous avons retenu la méthode à l'orcinol proposée par TILLMANS et PHILIPPI (94) modifiée par RIMINGTON (76, 77).

L'orcinol (ou 3,5-dihydroxytoluère) donne avec les hexoses en milieu sulfurique et à chaud une coloration brun orangée.

Il semblerait que se forment à partir des sucres des dérivés du Furfural avec lesquels se condense l'orcinol. Cette condensation s'effectue par de nombreux intermédiaires et qui varient avec la température et le temps de chauffage. Aussi la coloration varie au cours de son développement.

Il est donc important de traiter un témoin parallèlement au dosage. De plus, pour éviter l'interférence des protéines, il est nécessaire de mesurer la densité optique non à 420 nm (maximum d'absorption du chromogène), mais à 510 nm où l'interférence est nulle. Enfin, l'absorption variant avec la nature de l'ose, il est préférable de réaliser un étalon dont la composition en oses est voisine de celle de la glycoprotéine étudiée.

La technique suivie est celle exposée par MONTREUIL et SPIK (59). Les résultats sont exprimés par rapport à un étalon contenant galactose-mannose (2 - 1).

III – DOSAGE DES METHYL PENTOSES

DISCHE et SHETTLES (18) ont proposé une méthode de dosage des méthylpentoses basée sur la formation de méthyl-furfural en milieu sulfurique à chaud, et sur sa condensation avec du chlorhydrate de cystéine en formant un dérivé jaune.

Les hexoses réagissent de même en formant un hydroxyméthyl-furfural moins stable et dont le produit de condensation est brun. Pour en éviter l'interférence, le temps de chauffage est de 10 minutes.

La technique suivie est celle exposée par MONTREUIL et SPIK (59). Dans le cas de la présence d'oses, la lecture se fait à 396 nm et à 427 nm (longueur d'onde pour laquelle l'absorbance du fucose est presque nulle). La différence entre les deux absorbances permet de déterminer celle due au méthylpentose.

Il est à remarquer qu'au-delà de 40 µg/ml, l'absorbance ne varie plus quelle que soit la concentration. Il faut donc effectuer des dosages sur diverses dilutions de l'échantillon étudié.

Les protéines n'interfèrent pas dans ce dosage.

IV – DOSAGE DES OSAMINES

PAULY et LUDWIG (71) firent l'observation que la glucosamine en milieu alcalin donne avec l'acétylacétone des chromogènes se colorant en rouge violacé en présence du réactif d'Ehrlich.

ELSON et MORGAN (25) ont basé une méthode de dosage des hexosamines sur ce principe.

Il est à noter que les conditions de la réaction doivent être strictement respectées, et que des étalons doivent toujours être traités parallèlement. En effet, les proportions des chromogènes et leurs natures varient avec de nombreux facteurs des conditions expérimentales, or les maxima d'absorption varient d'un chromogène à l'autre.

De plus, les caractéristiques des spectres d'absorption varient en fonction de la configuration chimique de l'osamine. Aussi l'étalon devra se rapprocher par sa composition de la composition en osamines de la glycoprotéine étudiée.

Les protéines et les oses n'interfèrent pas dans ce dosage.

Les acides sialiques risquent d'interférer lors du dosage d'osamines libres. Par contre, les acides sialiques sont détruits par l'hydrolyse en milieu acide chlorhydrique concentré qui précède le dosage des hexosamines combinées.

En effet, suivant la technique de MONTREUIL et SPIK (59), nous faisons au préalable une hydrolyse chlorhydrique par l'acide chlorhydrique 4 N pendant deux heures dans un tube scellé et sous vide, nous éliminons l'acide chlorhydrique de l'hydrolysat sous vide puis procédons au dosage proprement dit.

– DOSAGE DES ACIDES SIALIQUES

Nous utilisons la réaction de WARREN (98), qui ne permet de doser que les acides sialiques libres. Ceux-ci se trouvent en position externe dans les molécules de glycoprotéides, et leur libération totale peut être facilement réalisée. Etant donné la destruction facile des molécules d'acide sialique par l'acide chlorhydrique 0,1 N à 80° pendant une heure, cette hydrolyse est réalisée par de l'acide sulfurique 0,2 N à 80° C pendant une heure.

Cette hydrolyse présente cependant des inconvénients :

- elle peut ne pas être totale ;
- des molécules d'acide sialique risquent d'être détruites.

Son avantage par contre est que peu d'oses sont libérés, sauf un peu de fucose (MONTREUIL et SPIK, 59).

Le dosage colorimétrique de WARREN que nous appliquons ensuite est basé sur l'oxydation dans un premier temps des acides neuraminiques par l'acide périodique. Il y a formation d'acide β formyl-pyruvique, que l'on condense dans un second temps avec l'acide 2-thiobarbiturique pour donner un composé dont la coloration, rose, est extraite par un solvant organique. Nous utilisons la cyclohexanone.

Il est à noter que :

- les colorations données par les divers acides sialiques ont des absorbances molaires différentes ;
- tous les composés donnant des aldéhydes par oxydation périodique peuvent interférer. Or, un peu de fucose peut être libéré lors de l'hydrolyse précédant le dosage, il donne avec l'acide périodique de l'acétaldéhyde qui se condense avec l'acide thiobarbiturique et cause une légère interférence (MONTREUIL et SPIK, 59).

TROISIEME PARTIE

PREPARATION DE LA PROTEINE
ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE
ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE

CHAPITRE I

PREPARATION DE LA PROTEINE ET RESULTATS

INTRODUCTION – EXPOSE DU PROTOCOLE

A la suite des données connues de la protéine exposées, Partie I, chap. 2, page 21 , le protocole de préparation que nous avions précédemment adopté comportait les étapes suivantes à partir de sérum ou de fraction I, II, III de COHN :

- Relargage par le sulfate d'ammonium, 2,5 - 3 M pH 7
- Traitement par l'acide phytique 0,1 N pH 2,10,
- Chromatographie sur Séphadex G 200,
- Electrophorèse préparative en gradient de densité de saccharose,
- Purification finale par électrophorèse en gradient de densité (saccharose) et de pH (ampholine).

Mais les rendements obtenus étaient désastreux.

Aussi, avons-nous cherché d'une part à éliminer les étapes peu rentables, et d'autre part à introduire de nouvelles techniques éventuellement plus intéressantes.

Dans le nouveau protocole opératoire adopté, nous éliminons la chromatographie sur Séphadex G 200 en raison de la longueur de l'opération, inconvénient qui n'était pas compensé par un rendement suffisant. Pour la même raison, nous supprimons l'électrophorèse en gradient de densité.

L'électrophorèse finale en gradient de densité et de pH nous avait permis dans le précédent protocole de préciser le point isoélectrique de la protéine étudiée. Mais là encore, les rendements obtenus étaient défavorables, les opérations longues en raison d'une part de la faible prise d'essai applicable à chaque expérience même dans une colonne préparative, et d'autre part du long temps de migration; enfin, nous avons pensé aux perturbations que les amines ou les peptides présents dans le milieu de migration pourraient apporter à la protéine, ces composés pouvant soit dénaturer la protéine, soit se fixer sur celle-ci de manière suffisamment solide pour que la dialyse n'élimine pas ces petites molécules. Dans les deux cas, nous pouvions alors craindre des modifications du comportement de la protéine vis-à-vis de l'histamine.

Nous avons conservé le relargage par le sulfate d'ammonium en retenant la fraction 2,4 à 3,3 M - pH 7, et la précipitation phytique.

En effet, le relargage par le sulfate d'ammonium nous permettait d'appauvrir

considérablement le milieu en globuline α_1 GP aisément précipitable, postalbumine, globuline Gc, inter α_1 inhibiteur de trypsine, haptoglobine, céruleoplasmine α_2 macroglobuline, α_2 lipoprotéine, α_2 HS glycoprotéine, β_1 lipoprotéine β_1 A et β_1 C globulines 2 glycoprotéine ; immunoglobulines IgG, IgM, IgA. Par contre, la zone de relargage retenue laissait présents dans le précipité en même temps que la protéine cherchée : albumine, préalbumine, orosomucoïde, α_1 lipoprotéine, α_1 antitrypsine, α_1 glycoprotéine pauvre en tryptophane, α_1 x glycoprotéine, α_2 neuraminoglycoprotéine, transferrine et hémopexine. Surtout, nous avons conservé ce stade de préparation car nous avions observé précédemment que l'activité était environ décuplée (AGNERAY et Al., 4), phénomène que DURAND (22) avait attribué :

- soit à la destruction d'une combinaison avec une protéine qui rend en temps normal la protéine captante moins active,
- soit à la libération de sites supplémentaires sur la protéine captante,
- soit à l'élimination d'un inhibiteur au cours du fractionnement.

AGNERAY (3) a montré que les hétéroprotéines, à faible teneur en glucides, sont précipitables par l'acide phytique et que le surnageant de précipitation phytique est constitué uniquement de glycoprotéines dont certaines ont des caractéristiques de relargage les plaçant dans la même zone que la protéine étudiée ; ce sont : la préalbumine, l'orosomucoïde, l' α_1 antitrypsine, l' α_1 x GP, l' α_2 neuramino GP.

Nous devons les retrouver dans le surnageant de précipitation phytique.

Des caractéristiques (poids moléculaire ou constantes d'ultracentrifugation) nous avons déduit que les poids moléculaires permettaient à ces protéines d'être exclues alors que le poids moléculaire plus élevé de la protéine étudiée lui permettait d'être retenue, par passage sur membrane X M 100 A. De plus, le passage sur membrane nous permet une élimination de l'acide phytique par diafiltration avec de l'eau déminéralisée et une concentration du surnageant phytique, évitant l'opération longue et fastidieuse de concentration en boudin de cellophane, en enceinte ventilée.

La connaissance du point isoélectrique nous a amenés à essayer comme stade ultime de purification le passage sur un échangeur d'ions.

La carboxyméthylcellulose est un échangeur acide faible donc cationique. A pH 4,2, la protéine recherchée, dont le pIE est de $4 \pm 0,1$, est chargée positivement, donc n'est pas fixée par l'échangeur. Nous procédons à une première élution par un tampon pH 4,2 - 0,1 M qui nous permet de séparer la protéine cherchée, puis nous disons passer un tampon pH 4,8 - 0,1 M avant de laver la colonne à la soude 0,025 N

Nous verrons les résultats des essais préliminaires de ces deux techniques avant d'exposer la technique et les résultats du schéma définitif de préparation.

CHAPITRE II

ESSAIS PRELIMINAIRES DE LA DIAFILTRATION

Nous avons appliqué la technique de diafiltration à des échantillons de sérum avant de l'intégrer dans notre schéma de préparation définitif. Le choix des membranes a été fait en fonction de leurs caractéristiques d'exclusion dans le but de permettre à la protéine recherchée d'être retenue dans la cellule, alors que les impuretés à éliminer passaient, à travers la membrane, dans le diafiltrat. Aux glycoprotéines phytosolubles présentes dans la préparation résultant du relargage à pH 7 entre 2,4 et 3,3 M au sulfate d'ammonium (orosomudoïde, α_1 antitrypsine, α_1 GP, α_2 neuramino GP, α_2 HS GP) s'ajoutaient la préalbumine (également normalement présente) et l'albumine qui souille toutes nos préparations.

Nous avons essayé deux membranes : XM 300 et XM 100 A, en utilisant dans chaque cas un échantillon de sérum humain puis un échantillon de sérum de Porc. Nous comparons les activités pharmacologiques et les caractéristiques électrophorétiques et immunoélectrophorétiques des retenues de diafiltration.(voir P. 2 Chap. V, page 37)

I — MEMBRANE XM 300 :

Le seuil d'exclusion de cette membrane est un PM de 300 000, mais à condition que les molécules soient sphériques et en solutions pures. En fait, il vaut mieux parler d'indice de rétention. Cette membrane, d'après le fabricant, retient 10 p. cent d'albumine, 65 p. cent d'immunoglobuline 7 S, de poids moléculaire 160 000, mais laisse totalement passer le Dextran 110 de poids moléculaire 110 000.

A — Sérum Humain

1 - Technique :

Un échantillon de 45 ml de sérum humain à 72 g p. mille de protides, est dilué à 180 ml par une solution de chlorure de sodium à 4 p. mille, puis introduit dans une cellule de diafiltration Amicon n° 202, de 180 ml, reliée à un réservoir contenant 700 ml de solution saline de chlorure de sodium à 4 g p. mille. L'expérience est réalisée à une température de + 4° C sous une pression d'azote de 0,7 bar et avec agitation constante. Le diafiltrat est recueilli dans un collecteur de fractions ; les échantillons regroupés par volume de 100 ml, sont dialysés, concentrés et lyophilisés ainsi que le retenu.

2 - Résultats :

(a) - Activité pharmacologique.

L'étude de la diminution de l'activité de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye montre que seule la fraction retenue possède une activité pharmacologique, que nous pouvons comparer à l'activité du sérum de départ. (Tab. I)

(b) - Physico-chimie.

La méthode du biuret nous a permis d'évaluer le taux de protides : nous avons mis dans la cellule 45 ml de sérum à 72 g. p. mille de protides, soit 3,24 g. de protides ; dans le retenu de diafiltration nous trouvons 1,80 g. de protides soit un rendement de 55 p. cent. Le rendement total étant de 97 p. cent.

L'électrophorèse à pH 8,6 en tampon véronal sur acétate de cellulose, permet d'attribuer au sérum initial et à la fraction retenue les compositions suivantes :
(page ci contre).

L'électrophorèse à pH 3,9 en tampon pyridine-acide acétique permet d'affirmer l'absence d'orosomudoïde.

L'immunoélectrophorèse contre un immunsérim antisérum humain total montre la présence d'albumine, d'un arc α_1 que l'on peut penser être l'antitrypsine, de deux arcs α_2 qui semblent être la céruléoplasmine et l'haptoglobine de deux arcs β dont l'un semble être la sidérophiline, et des trois immunoglobulines IgG, IgA, IgM.

3 - Discussion :

La diafiltration d'un échantillon de sérum humain sur membrane XM 300 par 10 fois son volume de solution de chlorure de sodium à 4 p. mille entraîne un enrichissement de 4 285 fois si l'on compare le nombre d'unités par mg de protide dans le sérum initial et dans la fraction lyophilisée.

La comparaison du nombre total d'unités entre ces deux mêmes échantillons montre une augmentation globale d'activité de 2 945.

Or, par chromatographie sur Séphadex G 200, le facteur étudié est élué dans un rapport Ve/Vo de 1,30 à 1,58, semblable à celui établi sur le produit initial. La molécule protéique n'a donc pas subi une diminution de poids moléculaire décelable par cette technique. On peut rapprocher cette augmentation d'activité de celle observée lors du relargage par le sulfate d'ammonium (AGNERAY et Al., 4), bien que par diafiltration, l'augmentation soit beaucoup plus considérable.

B — Sérum de Porc

1 - Technique :

Un échantillon de 20 ml de sérum de Porc est dilué à 180 ml par une solution à 4 p. mille de chlorure de sodium puis introduit dans une cellule Amison n° 202 de 180 ml

TABLEAU 1

ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE DE FRACTION RETENUE PAR DIAFILTRATION DE SERUM HUMAIN SUR MEMBRANE XM 300

	x ng	1x U/mg protides	P/x U/préparation
Sérum humain	$1,8 \times 10^3$	$0,555 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$ (P = 3,240 g) (protéines)
Fraction retenue sur XM 300	0,42	$2,38 \times 10^6$	$4,3 \times 10^9$ (P = 1,800 g)

TABLEAU II

ELECTROPHORESE DE FRACTION RETENUE PAR DIAFILTRATION DE SERUM HUMAIN SUR MEMBRANE XM 300

	Sérum		Retenue	
	%	g	%	g
Albumine	61	1,97	57	1,02
α 1	4,5	0,15	0	0
α 2	10	0,32	11,5	0,21
β	10,5	0,34	16	0,29
γ	14	0,45	15,5	0,28
Alb/Glob.	1,56		1,32	

muni d'une membrane XM 300 et reliée à un réservoir de 4 litres. La diafiltration par 3 litres de solution saline est réalisée à une température de + 4° C sous une pression de 0,7 bar et avec agitation constante.

Après recueil du diafiltrat dans un collecteur de fractions, les échantillons regroupés par volumes de 400 ml sont dialysés, concentrés, lyophilisés. Le retenu est traité dans les mêmes conditions.

2 - Résultats :

a - Activité pharmacologique :

Chaque fraction est soumise à un essai d'activité pharmacologique.

La fraction obtenue après passage de 3 600 ml de solution saline présente une légère activité : 10 microgrammes de cette fraction inhibent le phénomène de 10 p. cent seulement.

Par contre, la fraction retenue présente une très grande activité que nous avons comparée à celle du sérum initial. (Tab. II)

b - Physico-chimie :

Par la méthode du biuret, nous déterminons que le taux de protides mis dans la cellule est de 1,340 g, et que le taux du retenu est de 1,100 g, soit un rendement de 18,2 p. cent.

L'électrophorèse à pH 8,6 en tampon véronal sur acétate de cellulose permet de comparer les pourcentages de chaque fraction dans le sérum initial et dans le retenu XM 300.

L'immuno-électrophorèse contre un immunsérum antisérum de Porc total révèle la présence d'albumine, d'haptoglobine et de céruléoplasmine au niveau des α_2 globulines, de sidérophilline au niveau des β_1 globulines et d'immunoglobuline IgG.

3 - Discussion :

1. - L'enrichissement par diafiltration est ici de 830 alors que l'augmentation globale d'activité est de 686.

La présence d'une faible activité dans le dernier volume ultrafiltré n'est pas surprenante puisque même des molécules comme les Immunoglobulines IgG, de poids moléculaire 160 000, ne sont, d'après le fabricant, retenues qu'à 65 p. cent.

C – Conclusion des expériences de diafiltration sur membrane XM 300 :

Nous avons observé un enrichissement intéressant et une augmentation globale de l'activité.

Sur le plan qualitatif, nous conservons malheureusement encore une forte quantité d'albumine qui continue à souiller ces préparations. Par contre, nous semblons avoir éliminé les molécules de poids moléculaire inférieur à celui de la protéine recherchée et en particulier nous avons totalement éliminé l'orosomucoïde.

Cependant, la membrane XM 100 A retenant mieux les protéines de poids moléculaire supérieur à 100 000, nous avons procédé à des essais sur cette nouvelle membrane.

II – MEMBRANE XM 100 A :

A – Sérum Humain :

1 - Technique :

Un échantillon de 20 ml de sérum humain à 64 p. mille de protides est dilué à 400 ml par une solution de chlorure de sodium à 4 p. mille et introduit dans une cellule Amicon de 400 ml, munie d'une membrane XM 100 A. La diafiltration est réalisée à + 4° C sous une pression de 0,7 bar avec agitation constante.

Le diafiltrat est recueilli dans un collecteur de fractions, les échantillons regroupés sont dialysés, concentrés et lyophilisés, ainsi que le retenu.

2 - Résultats :

a - Activité pharmacologique :

Nous ne trouvons aucune activité pharmacologique dans les fractions diafiltrées, seul le retenu de diafiltration montre une activité que nous comparons à celle du sérum initial.

b - Physico-chimie :

Les protides sont dosés par la méthode du biuret. L'échantillon initial contenait 1,280 g de protides, le retenu en contient 1,020 g ; le rendement est de 79 p. cent, alors que le rendement global est de 98 p. cent.

L'électrophorèse à pH 8,6 en tampon véronal sur acétate de cellulose nous a donné les profils électrophorétiques suivants :

L'électrophorèse à pH 3,9 en tampon pyridine-acide acétique montre l'absence d'orosomucoïde.

L'immuno-électrophorèse en gel d'agar contre un immunsérum antisérum humain total et en prenant comme référence le sérum initial, nous montre la présence d'albumine en grande quantité, d'un arc β, et d'immunoglobuline IgG.

3 - Discussion :

L'enrichissement par diafiltration est de 666 alors que l'augmentation globale d'activité est de 735.

TABLEAU III

ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE DE FRACTION RETENUE PAR DIAFILTRATION DE SERUM DE PORC SUR MEMBRANE XM 300

	x ng	1/x U/mg protides	P/x U/fraction
Sérum de Porc	$1,67 \times 10^3$	$0,598 \times 10^3$	801×10^3 (P = 1,100 g protide)
Fraction retenue sur XM 300	2	$0,50 \times 10^6$	550×10^6 (P = 1,100 g protide)

TABLEAU IV

ELECTROPHORESE DE FRACTION RETENUE PAR DIAFILTRATION DE SERUM DE PORC SUR MEMBRANE XM 300

	Sérum		Retenu	
	%	g dans la fraction	%	g dans la fraction
Albumine	47	0,63	43	0,47
α 1	0	0	0	0
α 2	20	0,27	17,5	0,19
β	16,5	0,22	24,5	0,27
γ	16,5	0,22	15	0,17
Alb/Glob.	0,88		0,75	

TABLEAU V

ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE DE FRACTION RETENUE PAR DIAFILTRATION DE SERUM HUMAIN SUR MEMBRANE XM 100 A

	x ng	1/x U/mg protide	P/x U/fraction
Sérum humain	2×10^3	$0,5 \times 10^3$	640×10^3
Fraction retenue sur XM 100 A	3	333×10^3	470×10^6 (P = 1,4096 g)

TABLEAU VI

ELECTROPHORESE DE FRACTION RETENUE PAR DIAFILTRATION DE SERUM HUMAIN SUR MEMBRANE XM 100 A

	Sérum		Retenu	
	%	g dans la fraction	%	g dans la fraction
Albumine	62	39,7	57	0,57
$\alpha 1$	5,5	3,5	0	0
$\alpha 2$	5	3,3	8	0,08
β	11	7	16,5	0,16
γ	16,5	10,5	18,5	0,18

TABLEAU VII

ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE DE FRACTION RETENUE PAR DIAFILTRATION DE SERUM DE PORC SUR MEMBRANE XM 100 A

	x ng	1/x U/m protide	P/x U/fraction
Sérum de porc	10×10^3	10^4	166×10^3 (P = 1,660 g)
Fraction retenue sur XM 100 A	9	111×10^3	132×10^6 (P = 1,190 g)

TABLEAU VIII

ELECTROPHORESE DE FRACTION RETENUE PAR DIAFILTRATION DE SERUM DE PORC SUR MEMBRANE XM 100 A

	Sérum		Retenu	
	%	g dans la fraction	%	g dans la fraction
Albumine	47	0,78	43	0,52
$\alpha 1$	0	0	0	0
$\alpha 2$	20	0,32	21	0,25
β	16,5	0,26	18	0,22
γ	16,5	0,26	18	0,22
Alb/Glob.	0,88		0,88	

L'électrophorèse et l'immuno-électrophorèse montrent un très léger appauvrissement en petites molécules. Les immunoglobulines semblent rester approximativement en même quantité, l'albumine est légèrement éliminée.

B — Sérum de Porc :

1 - Technique :

Un échantillon de 20 ml de sérum de Porc à 83 g p. mille de protides est dilué à 400 ml par une solution de chlorure de sodium à 4 p. mille et introduit dans une cellule Amicon n° 402 de 400 ml. La diafiltration est réalisée à + 4° C sous agitation constante et sous une pression de 0,7 bar.

Le diafiltrat, après recueil dans un collecteur de fractions et regroupement des échantillons, ainsi que le retenu,sont dialysés, concentrés et lyophilisés.

2 - Résultats :

a - Activité pharmacologique :

Seule la fraction retenue montre une activité que nous comparons à celle du sérum de départ.

b - Physico-chimie :

Par la méthode du biuret, nous trouvons 1,660 g de protides dans l'échantillon de départ, et 1,190 g dans le retenu de diafiltration, soit un rendement de 72 p. cent.

L'électrophorèse à pH 8,6 en tampon véronal, nous permet la comparaison suivante des profils électrophorétiques :

L'immuno-électrophorèse en gel d'agar à pH 8,6 en tampon véronal contre un immunsérum antisérum de Porc total nous montre la présence d'albumine en quantité moindre que dans le sérum, ainsi que la présence de presque tous les constituants du sérum initial.

III — DISCUSSION GENERALE

A — Activité pharmacologique

La diafiltration nous permet un enrichissement inférieur à celui observé lors des chromatographies sur Séphadex G 200, mais compensé par les meilleurs rendements obtenus. Par contre, nous observons ici une augmentation globale d'activité en général très importante et ne correspondant pas à une diminution du poids moléculaire sensible en chromatographie sur gel de Séphadex où nous retrouvons les mêmes caractéristiques de Ve/Vo pour le facteur actif. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse :

- soit du détachement d'un inhibiteur de faible poids moléculaire,
- soit même éventuellement de molécules d'histamine fixées in vivo liées par une liaison suffisamment labile pour que la manipulation effectuée les aient détachées. Il y a alors révélation de sites sur la protéine susceptibles de fixer et donc de dissimuler à l'action sur l'iléon des molécules d'histamine introduites dans le bain pour la détermination de l'activité pharmacologique.

B – Physico-chimie

Notre but était, grâce à l'emploi de membranes sélectives, d'éliminer certains constituants de poids moléculaire inférieur à celui du facteur cherché, en particulier l'albumine qui souille toutes nos préparations (PM 69 000) et les constituants normaux d'une fraction protéique précipitant entre 2,4 - 3,3 de molarité en sulfate d'ammonium à pH 7, et phytosolubles (préalbumine, orosomucoïde, α_1 anti-trypsine, α_1 x GP, α_2 neuramino GP, α_2 HS GP). Sur ce plan, l'expérience s'est révélée décevante : les électrophorèses et immuno-électrophorèses ne nous ont montré qu'une légère diminution dans la présence des constituants du sérum initial, en particulier la diminution du taux d'albumine est très faible. Il faut cependant tenir compte du fait que nous quantifions l'albumine par rapport aux globulines, or, celles-ci, en particulier celles de faible poids moléculaire, ont diminué. Nous faisons donc une erreur par excès. L'électrophorèse à pH 3,9 permet toutefois de conclure à une élimination totale de l'orosomucoïde dans le sérum humain. Ce problème ne se posait pas dans le sérum de Porc où l'électrophorèse à pH 8,6 met en évidence l'absence d'α_1 globulines et l'électrophorèse à pH 3,9 l'absence d'orosomucoïde.

Nous pouvons expliquer ces résultats décevants par une intense polarisation de la membrane : les molécules non filtrées tendent alors à former un gel qui diminue le débit. On peut pallier au mieux ce phénomène, sans jamais espérer le supprimer complètement, en jouant sur trois facteurs :

- avoir une concentration en protéines faible, inférieure à 0,7 p. cent,
- utiliser de faible pression d'azote dès le début de l'expérience, ne jamais dépasser 0,7 bar,
- agiter constamment et efficacement.

IV – CONCLUSION GENERALE

La diafiltration ne peut remplacer la chromatographie sur Séphadex G 200. Nous avons toutefois décidé de supprimer ce mode de séparation et d'insérer dans notre plan de préparation la diafiltration ; cette manipulation devant nous permettre d'appauvrir nos échantillons en certains constituants protéiques, d'éliminer l'orosomucoïde et également éliminer l'acide phytique très long à dialyser. D'autre part, nous pouvons aussi concentrer l'échantillon en faisant suivre la diafiltration d'une ultrafiltration.

Nous préférons la membrane XM 100 A, dont les caractéristiques de rétention sont mieux adaptées à notre problème.

Nous respectons les conditions optimales exposées précédemment de concentration protéique minimale, pression d'azote basse et agitation.

Nous choisissons l'eau déminéralisée pour diluer et diafiltrer l'échantillon.

S.H. Témoin

Immun S. Total

Sérum traité

Alb. Témoin

Anti-Alb.

Sérum traité

S.H. Témoin

Immunsérum Total

Diafiltration

Electrophorèse
de la F. Diafiltrée

S.H. Témoin

Immun S. Total

F. Diafiltrée
issue de C.M.C.

S.H. Témoin

Anti Alb.

F. Diafiltrée issue de C.M.C.

Fig. 6 - Electrophorèse des fractions diafiltrées.

CHAPITRE III

ESSAIS PRELIMINAIRES DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR CARBOXY-METHYL-CELLULOSE

I – Introduction

Nous savons que la carboxy-méthyl-cellulose est un échangeur cationique faible.

La glycoprotéine cherchée présente par la méthode de l'électrofocalisation un point isoélectrique de 4,0 ± 0,1. Or l'impureté pondéralement majeure à éliminer est l'albumine, de point isoélectrique 4,9.

Si nous nous plaçons en tampon pH 4,2, la protéine est en milieu basique par rapport à son point isoélectrique, elle sera donc chargée négativement, et ne se fixera pas sur l'échangeur. Parmi les protéines sériques, seul l'orosomucoïde a un point isoélectrique (2,7) qui lui confère à pH 4,2 une charge négative l'empêchant d'être fixé par l'échangeur. Les autres protéines sériques, se trouvant en milieu plus acide que leur point isoélectrique, sont fixées, elles seront détachées de la colonne par l'emploi successif de trois tampons de pH croissant en milieu ionique constant.

II - Techniques

Les quatre éluants utilisés sont successivement :

1 - Tampon acéto-acétique 0,1 M pH 4,2
2 - " " 0,1 M pH 4,8
3 - " " 0,1 M pH 5,5
4 - " " 0,025 N.

La CMC 52 (Whatmann) échangeuse est fournie sous forme prégonflée. Nous réalisons par précaution avant le premier emploi l'opération de précyclage. Puis, nous équilibrons dans le tampon (1).

La chromatographie est réalisée en phase descendante dans une colonne Sofranie de 35 mm de diamètre et 60 cm de hauteur fermée à chacune de ses deux extrémités par un piston de hauteur réglage et muni d'un disque poreux.

L'échantillon protéique appliqué est dissous à une concentration de 2,5 p. cent dans le tampon (1).

Nous passons successivement quatre échantillons en quatre chromatographies successives.

A - Retenu de diafiltrat XM 100 A de sérum humain
B - " " XM 300 " "
C - " " XM 100 A de sérum de Porc
D - " " XM 300 " "

La régularisation du débit est réalisée par pompage positif à l'aide d'une pompe Perpex LKB (qui permet d'éviter les retours d'éluant) à un débit de 15 ml/heure/cm2.

Pour chaque chromatographie, les fractions correspondant à chaque tampon d'élution sont, après recueil sur collecteur de fractions, regroupées, dialysées, concentrées et lyophilisées.

III - Résultats

Activité pharmacologique :

Nous ne trouvons une activité que dans la fraction non fixée sur l'échangeur (fraction éluée par le tampon 0,1 M pH 4,2).

Nous comparons dans le Tableau IX, les activités des divers échantillons traités, avant et après passage sur carboxy-méthyl-cellulose.

Les immuno-électrophorèses en gel d'agarose des échantillons humains contre un immunsérum antisérum humain (Fig. 6) montrent dans les deux échantillons traités, deux arcs de mobilité :

- l'un pré-albuminique ou albuminique,
- l'autre β_1 globulinique.

Les immuno-électrophorèses en gel d'agarose contre un immunsérum anti-albumine humain montrent dans les deux échantillons provenant de sérums humains, un appauvrissement très important en albumine.

L'électrophorèse à pH 3,9 en tampon pyridine acétique, confirme l'absence totale d'orosomucoïde dans les deux échantillons provenant de sérum humain.

IV – Discussion

L'enrichissement n'est pas considérable.

Nous ne notons aucune augmentation globale d'activité. Par contre, nous semblons avoir une séparation sélective de la protéine recherchée. De l'albumine souille toujours un peu nos préparations, mais la diminution de sa concentration semble très importante.

De plus, le passage sur carboxy-méthyl-cellulose, dans ces conditions d'utilisation, nous confirme que le point isoélectrique de la protéine étudiée est inférieur à pH 4,2.

Toutefois, dans ce type de chromatographie sur échangeurs d'ions, intervient

TABLEAU IX

COMPARAISON DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES ECHANTILLONS PROTEIQUES AVANT ET APRES PASSAGE SUR CARBOXY-METHYL-CELLULOSE

		x ng	1/x U/mg protide	Enrichissement
XM 100 A Sérum humain	avant CMC	3	333×10^3	
	après CMC	0,12	$8\,300 \times 10^3$	25
XM 100 A Sérum de Porc	avant CMC	9	111×10^3	
	après CMC	0,56	$1\,776 \times 10^3$	16
XM 300 Sérum humain	avant CMC	0,42	$2,38 \times 10^6$	
	après CMC	0,10	25×10^6	10,5
XM 300 Sérum de Porc	avant CMC	2	$0,50 \times 10^6$	
	après CMC	0,13	$6,50 \times 10^6$	15

aussi l'affinité de l'échangeur pour les cations en présence, ici Na^+ et protéine $^+$.

Malgré la faible molarité choisie (0,1 M), le principe actif ne semble pas se fixer, fut-ce partiellement sur l'échangeur ; tandis que les constituants de point isoélectrique supérieur à 4,2 se fixent sur l'échangeur. Il faut excepter dans cette constatation l'albumine, toujours présente, bien qu'en faible quantité, dans les échantillons recueillis.

V - Conclusion

Cette technique de passage sur échangeur dans les conditions préconisées nous semble une excellente technique sinon d'enrichissement, sur le plan quantitatif, du moins de purification sur le plan qualitatif.

Nous la retenons dans notre mode de préparation et nous pensons l'appliquer aux échantillons provenant de passage sur membrane XM 100 A.

CHAPITRE IV

NOUVEAU PROTOCOLE DE PREPARATION

A la suite des résultats précédents, nous avons adopté un nouveau protocole de préparation que nous avons appliqué successivement à du sérum humain et à du sérum de Porc.

I — SERUM HUMAIN

Nous disposions d'un pool de 500 g de plasma humain lyophilisé (*).

A — Relargage par le sulfate d'ammonium :

Le plasma est dissous dans 20 l de chlorure de sodium à 4,5 p. mille. Nous opérons la précipitation selon trois zones de molarité en sulfate d'ammonium :

0	1,9 M	pH 7
1,9 M	2,4 M	pH 7
2,4 M	3,3 M	pH 7

Nous retenons le dernier précipité qui est dissous dans du chlorure de sodium à 8 p. mille, dialysé contre de l'eau déminéralisée fréquemment renouvelée et de façon prolongée, afin d'éliminer le plus soigneusement possible le sulfate d'ammonium qui serait particulièrement nuisible pour le stade suivant.

B — Précipitation phytique

Le volume de l'échantillon obtenu par relargage est de un litre, sa concentration protéique de 65 g. p. mille. Le milieu est dilué par trois litres d'eau déminéralisée, acidifié à pH 2,10 par de l'acide chlorhydrique environ 2 N puis additionné lentement et en agitant de 6 litres d'acide phytique 0,1 N pH 2,10.

Après s'être assuré qu'une partie aliquote du surnageant ne précipite plus par addition d'acide phytique, le milieu est abandonné 24 heures à + 4° C.

(*) Nous sommes heureux d'exprimer nos remerciements au commandant Saint-Blancard (centre de Transfusion et Réanimation Jean Julliard) qui nous a très obligeamment fourni le plasma lyophilisé traité.

Le précipité est séparé par filtration ou centrifugation.

Le surnageant est amené à pH voisin de 6 à l'aide de soude environ 2 N.

L'élimination de l'acide phytique se fait pas diafiltration.

C – Passage sur membrane XM 100 A

La cellule utilisée a un volume de 2 litres (cellule Amicon n° 2000). Elle est reliée à un réservoir de 10 litres.

Les 10 litres de surnageant phytique sont diafiltrés par environ 100 litres d'eau déminéralisée sous une pression de 0,7 bar.

Puis la solution protéique est concentrée à un volume de 200 ml par ultrafiltration dans la même cellule. Le concentrat lyophilisé correspond à 8,20 g de poudre.

D – Passage sur Carboxy méthyl cellulose

L'échangeur CMC 52 est livré précyclé par le fabricant. Après équilibrage avec le tampon pH 4,2 - 0,1 M, élimination des particules fines, nous remplissons la colonne de chromatographie Sofranie de 35 mm de diamètre et 60 cm de hauteur fermée par un piston et un disque poreux à chacune de ses extrémités.

L'échantillon protéique est dissous à une concentration de 4 g dans 100 ml de tampon pH 4,2 - 0,1 M, dialysé 48 heures contre le même tampon, puis centrifugé ; le surnageant de centrifugation est introduit dans la colonne par pompage positif à une vitesse de 15 ml/heure/cm2, soit 120 ml/heure dans ce cas.

L'élution de la colonne est suivie par lecture à 280 nm, à l'aide d'un Uvicord II LKB, couplé avec un enregistreur LKB.

Nous faisons passer successivement :

- le tampon pH 4,2 - 0,1 M
- le tampon pH 4,8 - 0,1 M
- la soude 0,025 N.

L'éluat est recueilli sur un collecteur de fractions ; les fractions regroupées sont dialysées contre de l'eau déminéralisée, concentrées et lyophilisées.

La première fraction qui doit contenir la protéine recherchée, correspond à 720 mg de poudre.

II – SERUM DE PORC

A – Relargage par le Sulfate d'ammonium

Nous diluons 12,5 litres de sérum dans un volume égal d'une solution de NaCl à 4 p. mille, avant de procéder au relargage par le sulfate d'ammonium.

Nous retenons trois zones de relargage de molarité en sulfate d'ammonium :

0 à 1,9 M pH 7,
1,9 à 2,4 M pH 7,
2,4 à 3,3 M pH 7.

Seule la troisième fraction est redissoute dans du NaCl à 8 p. mille, soigneusement dialysée contre de l'eau déminéralisée et concentrée.

B — Précipitation phytique

L'échantillon obtenu a un volume de 1,5 litre et une concentration en protéine de 80 p. mille. Il est dilué par trois volumes d'eau déminéralisée, acidifié à pH 2,10 par de l'acide chlorhydrique environ 2 N, puis lentement additionné et en agitant de 6 volumes d'acide phytique 0,1 N pH 2,10.

On vérifie qu'une partie aliquote du surnageant ne précipite plus par l'acide phytique, avant de laisser le milieu 24 heures à + 4° C.

Après filtration ou centrifugation, le surnageant phytique est amené à pH voisin de 6, par de la soude environ 2 N.

C — Passage sur membrane XM 100 A

Les 15 litres de surnageant phytique obtenus sont diafiltrés par environ 10 volumes d'eau déminéralisée sous une pression de 0,7 bar.

L'ultrafiltration permet la concentration à 200 ml de l'échantillon qui, lyophilisé, correspond à 5 g de poudre.

D — Passage sur Carboxy méthyl cellulose

L'échangeur CM 52 précyclé, est équilibré avec le tampon pH 4,2 - 0,1 M, débarrassé des particules fines, et mis dans une colonne Sofranie de 35 mm de diamètre sur 60 cm de hauteur limitée aux deux extrémités par un disque poreux.

Les 5 g d'échantillon protéique sont dissous dans 120 ml de tampon d'équilibrage, dialysés contre le même tampon pendant 48 heures. Après centrifugation, le surnageant est introduit dans la colonne par pompage positif à 15 ml/heure/cm2, soit 120 ml/heure.

L'élution de la colonne est suivie par lecture à 280 nm à l'aide d'un Uvicord II LKB, couplé avec un enregistreur LKB.

La colonne est éluée selon le système du gradient discontinu par trois éluants successifs :

- Tampon pH 4,2 - 0,1 M
- Tampon pH 4,8 - 0,1 M
- Soude 0,025 N.

Après recueil sur un collecteur de fractions, les fractions regroupées sont dialysées contre de l'eau déminéralisée, concentrées et lyophilisées.

La première fraction, devant théoriquement contenir la protéine recherchée, correspond à 300 mg de poudre.

CHAPITRE V

ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE

Nous n'exposons ici que les résultats de l'activité pharmacologique. Les résultats des critères de pureté et de la composition physico-chimique sont exposés plus loin.

Le Tableau X nous montre :

- pour le sérum humain un enrichissement de 20 000 fois (comparaison des valeurs d'unité d'activité) et une augmentation globale d'activité de 23 fois (comparaison du nombre d'unités d'activité par fraction) ;

- pour le sérum de Porc un enrichissement de 130 000 fois et une augmentation globale d'activité de 17 fois environ.

TABLEAU X

ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE DES PREPARATIONS OBTENUES

	Sérum Initial	Fraction finale
1/- Sérum humain		
Poids poudre	500 g	720 mg
Poids de protides (Biuret)	350 g	403 mg
x (ng)	2×10^3	0,1
1/x (U/mg)	500	10^7
P/x	$17,5 \times 10^7$	403×10^7
2/- Sérum de Porc		
Poids ou volume	12,5 l	300 mg
Poids protides (Biuret)	1,037 g	127 mg
x (ng)	$13,7 \times 10^3$	0,1
1/x (U/mg)	73	107
P/x	$7,5 \times 10^7$	127×10^7

CHAPITRE VI

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES PREPARATIONS OBTENUES

Nous obtenons deux échantillons, l'un à partir de sérum humain : nous l'appelons F 947, l'autre à partir de sérum de Porc, nous l'appelons F 950.

Nous étudions ces échantillons pour voir leur degré de pureté, puis nous donnons les résultats des dosages de certains constituants.

I - CRITERE DE PURETE

Nous utilisons un certain nombre de techniques, nous les exposons successivement :

A - Electrophorèse :

Les électrophorèses sont effectuées à pH 8,6 en tampon véronal, sur acétate de cellulose, pendant trois quarts d'heure, sous une tension de 200 volts.

Par coloration au noir amide (amidoschwartz), nous n'obtenons aucune révélation même en surchargeant les dépôts.

Nous essayons une coloration au Bleu de Comassie à 1 p. cent dont la sensibilité, cinq fois plus grande que celle du noir amide, nous permet de mettre en évidence une zone de mobilité albuminique (Fig. 7).

Par oxydation périodique et recoloration du réactif de Schiff, nous vérifions que cette protéine, de mobilité albuminique, est une glycoprotéine (Fig. 7).

B - Immunoélectrophorèse :

Nous effectuons des immuno-électrophorèses sur agarose, la migration est réalisée dans un tampon véronal de pH 8,2, pendant 1 h 15 sous une tension de 280 volts.

1 - La préparation F 947 (origine humaine) montre avec un immunsérum antisérum humain total une zone de précipitation, difficile à voir, au niveau de l'albumine.

Avec un antisérum anti-albumine humain, nous avons une zone extrêmement diffuse, impossible à décolorer, mais sans que l'on puisse conclure à une précipitation.

Avec un immunsérum anti IgG il n'y a aucun arc ou zone de précipitation formée.

2 - La préparation F 950 (origine porcine) montre avec un immunsérum antisérum de Porc total une zone floue de précipitation au niveau albuminique.

C - Polyacrylamide :

Par migration en gel de polyacrylamide (selon la technique décrite P. 2 Chap.7) avec un témoin sérum humain total, nous voyons sur F 947 et F 950, après coloration au bleu de Comassie pour avoir une meilleure sensibilité, une bande de mobilité albuminique.

D - Gradient de concentration en gel :

Nous essayons alors de mieux préciser le poids moléculaire des constituants ainsi perçus ou devinés lors de l'emploi des techniques précédentes.

La migration en gradient de concentration en gel (selon la technique décrite Partie 3, Chap. 7, III) nous montre (fig. 8 - 9) de la cathode vers l'anode, c'est-à-dire dans le sens de la migration et en allant des mailles du gel de réticulation la plus large, vers les mailles de réticulation la plus fine :

- Témoin albumine humaine pure : (Behring) : des bandes de plus en plus nettes, jusqu'à la bande majeure. Le report sur le graphique nous montre que nous voyons successivement les divers polymères de poids moléculaire décroissant, jusqu'au monomère lui-même de pods moléculaire 69 000.

- Fraction F 947 (origine humaine) :

  . une bande de faible intensité au niveau du monomère de l'albumine, laissant prévoir une impureté albuminique ;

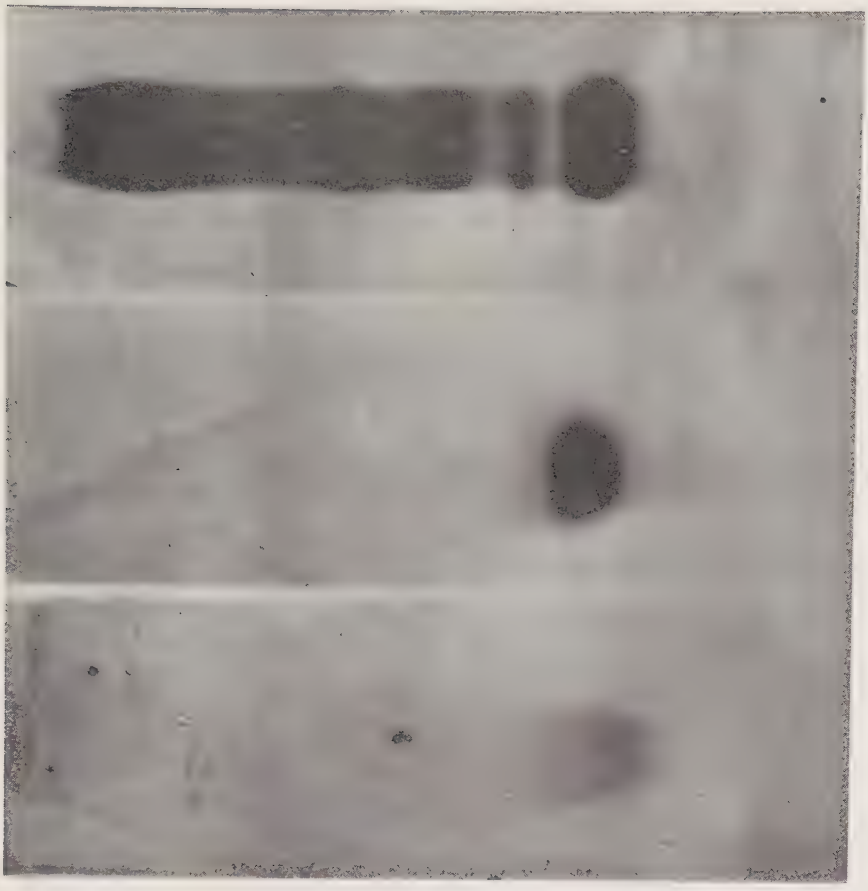
  . une bande beaucoup plus intense au niveau du poids moléculaire 110 000, correspondant à la protéine cherchée ;

  . nous devinons dans les poids moléculaires plus élevés une ou deux bandes qui peuvent être soit des impuretés, soit des polymères des deux fractions précédentes.

- Fraction F 950 (origine porcine) :

  . une bande de faible intensité au niveau du monomère de l'albumine, laissant ici aussi prévoir une impureté d'albumine ;

  . une bande plus intense au niveau de poids moléculaire 120 000 : la protéine d'origine porcine semble avoir un poids moléculaire légèrement supérieur à celle d'origine humaine.



S.H: Témoin
Bleu Comassie

F 947
Bleu Comassie

F 950
Bleu Comassie

S.H. Témoin
PAS

F 947
PAS

Fig. 7 - Electrophorèse des échantillons protéiques obtenus.

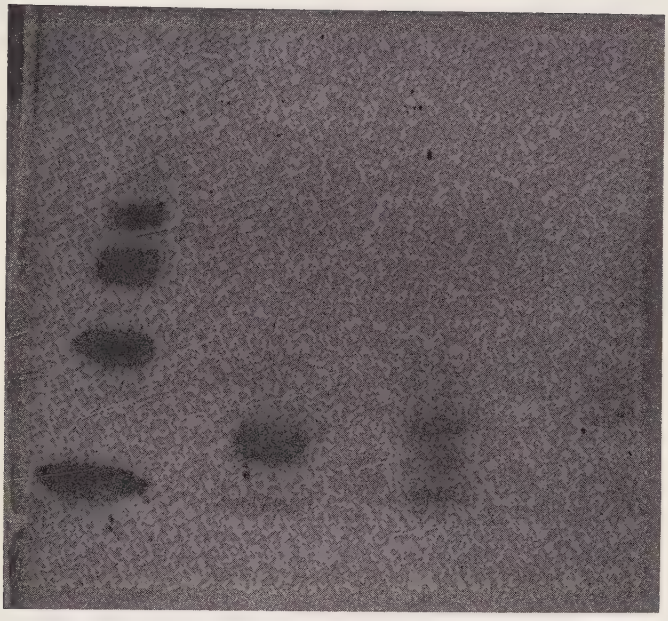


Fig. 8 - Electrophorèse en gradient de concentration en gel

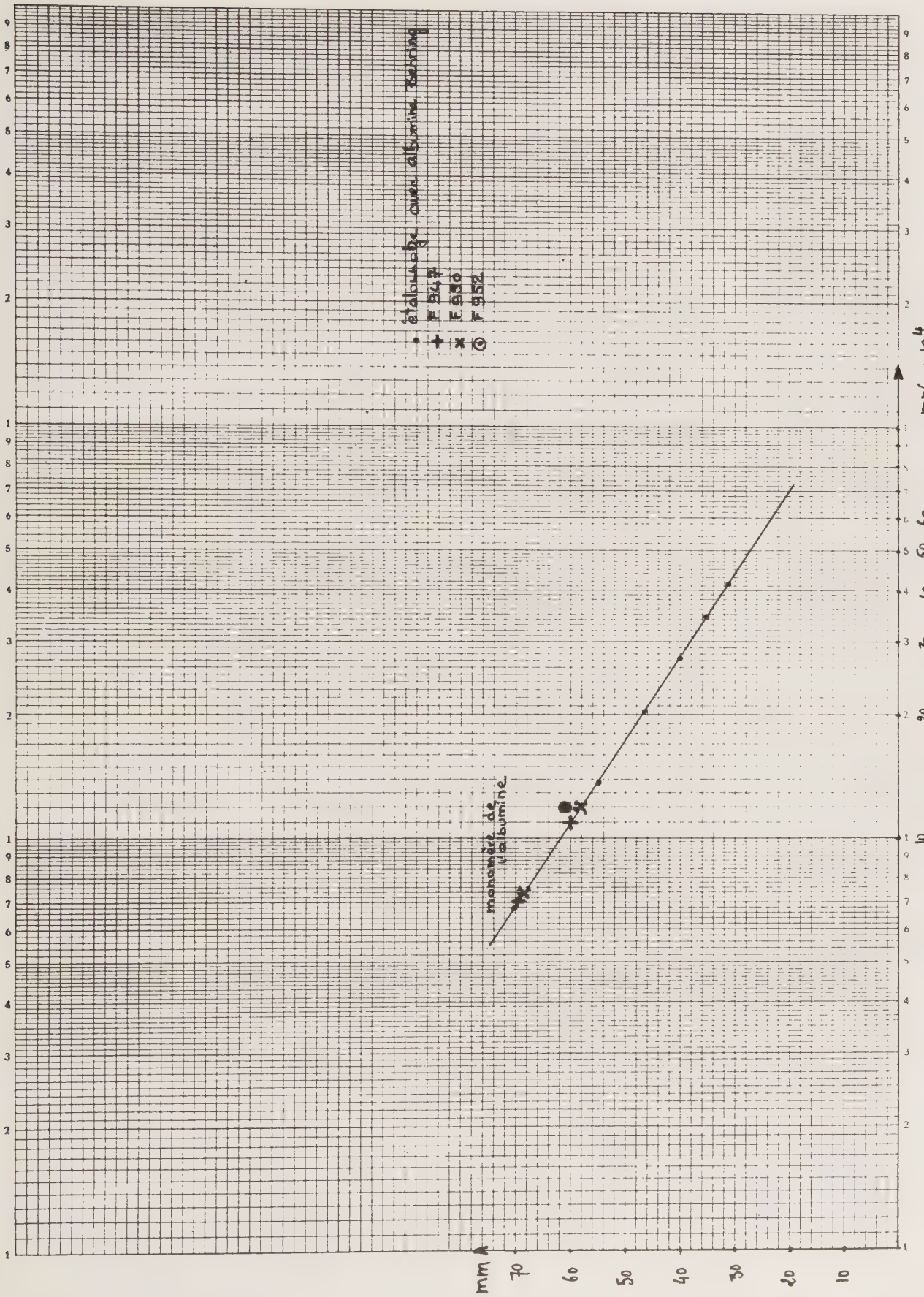


fig. 9
Etalonnage de l'électrophorèse en gradient de concentration en gel de polyacrylamide

- Fraction F 952 (origine porcine) :

. au niveau du monomère de l'albumine il ne semble pas y avoir de bande nette.

. une bande au niveau de poids moléculaire 120 000 confirme la valeur précédemment avancée.

E - Immunoélectrophorèse quantitative :

Nous faisons appel à la technique d'immuno-électrophorèse quantitative pour essayer de mettre en évidence la protéine étudiée, les impuretés devinées ou perçues grâce aux techniques précédentes, de préciser la nature de ces impuretés et d'éventuellement les quantifier.

Dans ce but, nous sommes amenés à apporter quelques variantes (que nous exposons) dans la technique de base (décrite, Partie II, chap. 8).

1 - Immuno-électrophorèse bidimensionnelle (Clarke et Freeman, 14 - Laurell, 50, 50 bis)

a - Expérience :

- Nous prenons un échantillon de 0,6 mg de F 947 sous un volume de 3 µl comme prise d'essai.
Dans un gel à 1 p. cent d'agarose exempt d'immunsérum, nous faisons une première migration électrophorétique sous une tension de 10 V/cm pendant une heure.

- Nous prenons une bande de 2,5 cm du gel précédent correspondant à la zone de migration électrophorétique, nous la transférons sur ce qui sera l'extrémité cathodique d'une nouvelle plaque. Nous couvrons la surface restante de la plaque avec 12 ml d'une solution d'agarose contenant 1 p. cent d'immunsérum de Lapin (Behringwerke lot T 1585 AZ), antisérum humain total. Nous effectuons une migration dans le sens perpendiculaire au précédent.

Le champ électrique appliqué ici est faible : 2,5 V/cm pendant 16 heures. En effet, se produisent deux phénomènes simultanés : migration électrophorétique et précipitation antigène-anticorps.

b - Résultats :

Nous voyons parfaitement un pic de mobilité albuminique, nous devinons une ligne de précipitation de mobilité β (figure 10).

2 - Tandem avec albumine et immunsérum antisérum humain polyvalent

Nous ne savons si la protéine de mobilité albuminique correspond à l'albumine, ou à la protéine étudiée.

Nous réalisons une migration en deux temps :

- dans un premier temps, les échantillons de nature différente, dont le point de départ est décalé de 1 cm, migrent l'un derrière l'autre sur la même ligne (Fig. 11 A) dans un gel d'agarose dépourvu d'immunsérum. On réalise quatre migrations parallèles du même type sur la même lame. La migration terminée, on découpe quatre bandes semblables correspondant à chacune des migrations parallèles ;
- dans un deuxième temps, on reporte l'une des bandes précédentes sur une nouvelle lame du côté cathodique. On coule sur la partie libre de la lame un gel d'agarose contenant l'immunsérum (Fig. 11 B). La seconde migration est ensuite réalisée dans un sens perpendiculaire au premier.

En cas de communauté antigénique, il y a confluence en tandem des deux échantillons (KRØLL, 44).

a - Expérience :

L'échantillon témoin est constitué par un dépôt sous 4 µl de 4 µg d'albumine standard humaine (Behringwerke).

L'échantillon étudié est constitué par 0,8 mg de F 947 sous un volume de 4 µl.

La première migration dure une heure, sous une tension de 10 V/cm.

Puis, nous découpons quatre bandes de 2,5 cm de large correspondant à chaque ligne de migration. Nous reportons l'une des bandes sur l'extrémité cathodique d'une nouvelle plaque.

Nous couvrons la surface restante avec 12 ml d'une solution de gel d'agarose à 1 p. cent d'immunsérum de Lapin polyvalent Behringwerke (Lot T 1585 AZ).

La seconde migration, perpendiculaire à la première correspond à un double phénomène : migration électrophorétique et précipitation antigène anticorps. Nous appliquons un voltage moindre : 2,5 V/cm, mais pendant plus longtemps : 16 heures.

b - Résultats :

La figure 12 montre un pic net important correspondant à l'albumine, avec un épaulement très léger. Nous nous demandons si la faible quantité d'impureté albuminique de F 947, trop importante par rapport à l'albumine témoin, montre une confluence antigénique difficile à percevoir en raison de la disproportion des quantités en présence.

Nous percevons d'autre part un pic étalé de surface importante mais de contour flou, correspondant vraisemblablement à la protéine étudiée.

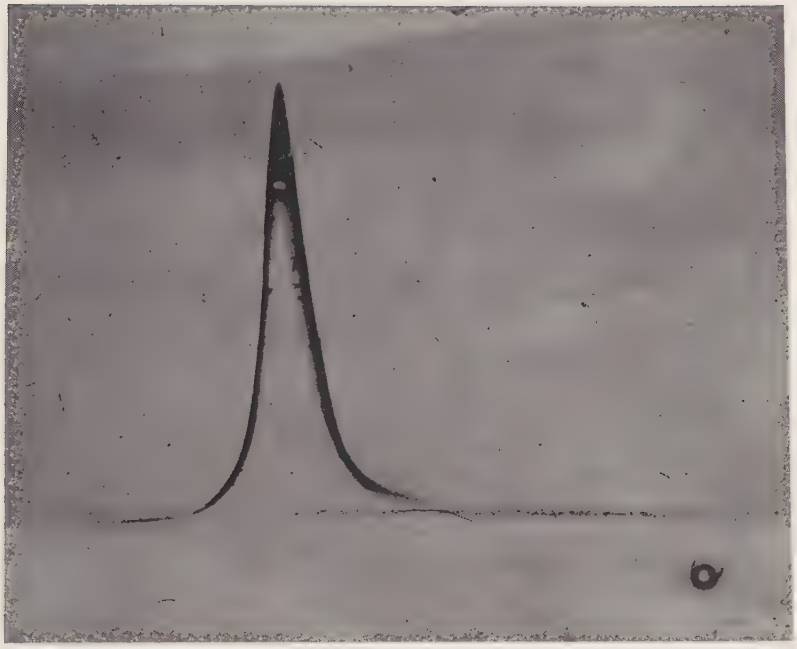


Fig. 10

Immuno-électrophorèse bidimensionnelle

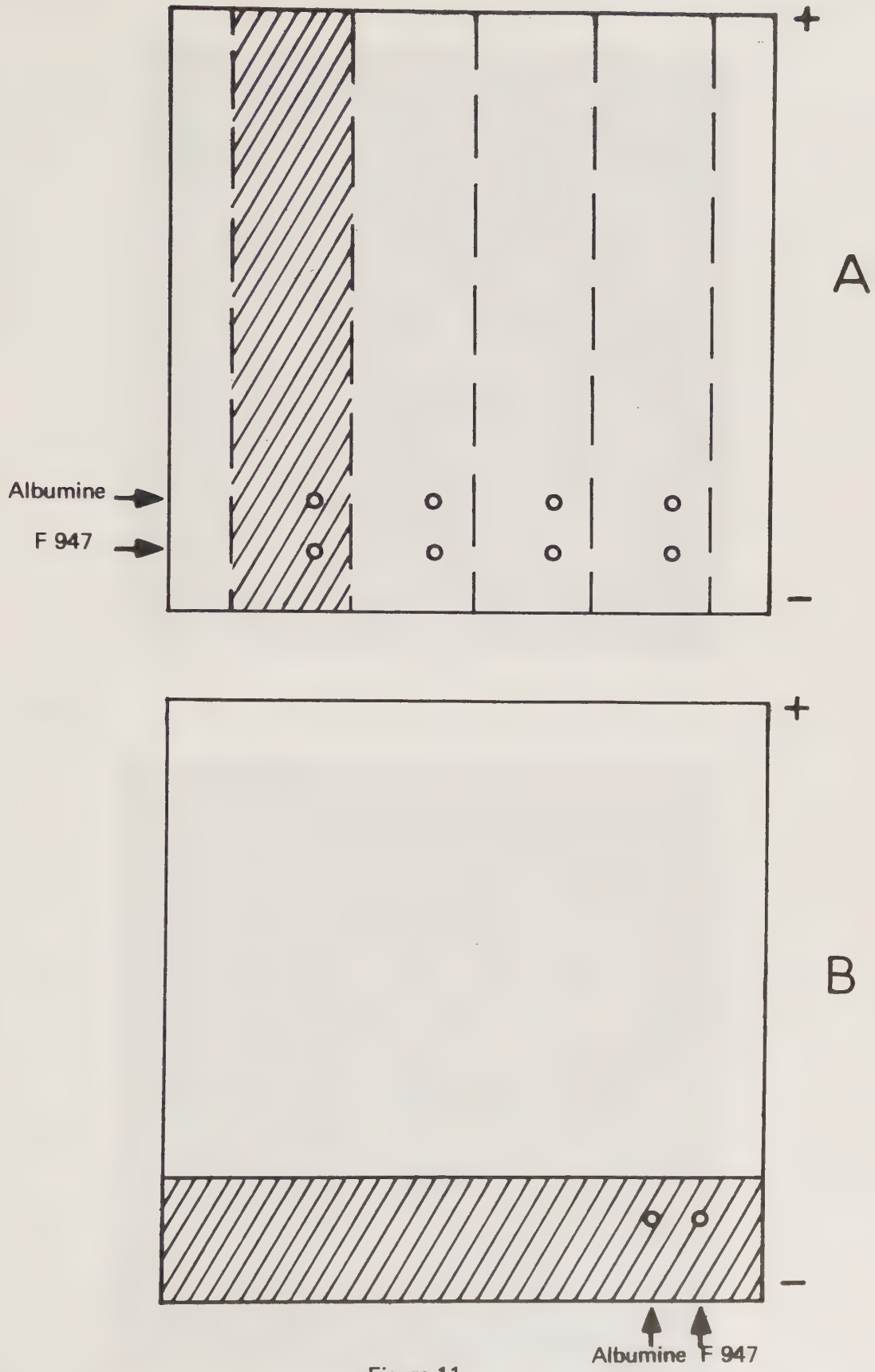


Figure 11

Expérience de Tandem

Fig. 12

Tandem avec albumine et immunsérum antisérum humain polyvalent

Fig. 13

Tandem avec albumine et immunsérum antialbumine humaine

3 - Tandem avec albumine et immunsérum antialbumine humaine

Afin de mieux préciser la communauté antigénique nous répétons la même expérience que précédemment, mais en diminuant les quantités d'albumine témoin et en utilisant un immunsérum spécifique antialbumine humaine.

a - Expérience :

Nous opérons comme il a été exposé dans la précédente expérience.

L'échantillon d'albumine correspond à 0,7 µg d'albumine standard (Behringwerke) sous 4 µl. L'échantillon étudié correspond à 0,8 mg de F 947 sous un volume de 4 µl.

La première migration dure une heure sous une tension de 10 volts/cm.

Nous découpons quatre bandes sur cette première lame correspondant à chaque ligne de migration.

Nous reportons l'une des bandes sur une seconde lame, du côté cathodique. Nous coulons 12 ml de gel d'agarose à 0,8 p. cent en immunsérum de Lapin antialbumine humaine (Behringwerke T 2139 A).

La seconde migration, perpendiculaire à la première, est effectuée pendant 16 heures sous une tension de 2,5 V/cm.

b - Résultat et discussion :

Nous voyons deux pics nets et confluents : l'un correspond à l'albumine témoin ; l'autre à l'impureté qui est, étant donné la confluence, de l'albumine de façon sûre (Fig. 13).

4 - Dosage selon la méthode de Laurell

Sachant que l'albumine existe à l'état d'impureté dans nos préparations, nous ne pouvons estimer son importance que par un dosage immunochimique. Nous utilisons la méthode de Laurell déjà décrite (Partie II, chap. 8).

Expérience

La gamme étalon est faite avec de l'albumine standard Behringwerke. Les dépôts sont de 4 µl.

L'échantillon F 947 est déposé parallèlement à la gamme sous le même volume.

Le gel à 1 p. cent d'agarose est additionné de sérum de Lapin antialbumine humaine (Behringwerke lot T 1585 AZ) en quantité voulue pour réaliser une centration de 0,5 p. cent.

La migration dure deux heures sous une tension de 7,5 V/cm.

Résultats et discussion :

La quantité d'albumine dans la prise d'essai est de 0,182 µg, ce qui nous permet de déduire que la concentration de l'albumine dans la préparation est de 1,1 p. mille (Fig. 14).

Nous en tirons deux conclusions :

- l'impureté albuminique est en quantité suffisamment faible pour paraître négligeable et nous autoriser à doser certains constituants aussi bien qu'à utiliser cet échantillon pour les premières études du mode de liaison de la protéine avec l'histamine ou avec l'iléon ;
- sur un plan plus général, la sensibilité de la méthode de Laurell qui permet de quantifier la présence de 0,182 µg d'albumine.

II - DOSAGE DE CERTAINS CONSTITUANTS ET APPROCHE DE LA COMPOSITION

Pensant que les impuretés présentes sont trop mineures pour apporter des erreurs importantes dans les dosages des constituants de la protéine, nous effectuons un certain nombre de déterminations :

A - Carbone – hydrogène – azote *

Les résultats sont reportés Tableau XI et nous montrent qu'il n'existe qu'une différence minime entre les deux fractions étudiées.

B - Protides

Le dosage des protides selon la technique de Gornall nous donne en pourcentage pour F 947 : 56 p. cent et pour F 950 : 42,8 p. cent.

Le dosage effectué selon la technique de Lowry nous donne en pourcentage pour F 947 : 66,6 p. cent et pour F 950 : 46,7 p. cent.

Mais dans le cas de la technique de Lowry, la présence d'une copule glucidique importante interfère dans le dosage et apporte des erreurs dans les résultats.

C - Saccharides

Nous effectuons les dosages des composants de la copule glucidique selon les techniques décrites (Partie II, chap. 9).

Les résultats sont reportés Tableau II.

Les résultats manquants dans le cas de la fraction d'origine porcine sont imputables au manque d'échantillons.

(*) Nous remercions Monsieur GARDENT, Pharmacien-Chef à la Pharmacie Centrale, d'avoir bien voulu effectuer ces dosages pour nous.

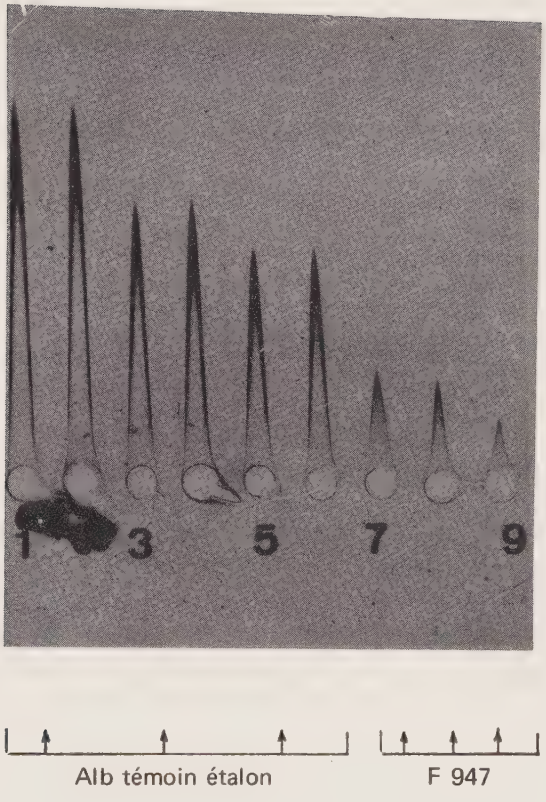


Fig. 14

Dosage de l'Albumine selon la méthode de LAURELL

TABLEAU XI

Pourcentage de C - H - N de la préparation d'origine humaine (F 947) et de celle d'origine porcine (F 950)

	C p. cent	H p. cent	N p. cent	Résidu incombustible
F 947	43,91	6,39	9,05	0,9
	43,72	6,32	8,91	0,7
F 950	41,83	6,20	8,09	3,1
	41,66	6,04	8,06	3,7

TABLEAU XII

Pourcentage des constituants de la copule glucidique des deux préparations F 947 et F 950 (Etalon : Gal - Man : 2 - 1).

	Hexoses (Orcinol) p. cent	Fucose p. cent	Osamines p. cent	Acides sialiques p. cent
F 947	16,9	1,3	14,3	15
F 950	16			

D - Acides aminés*

Après hydrolyse par l'acide chlorhydrique 6 N, 24 heures à 100° sous vide, puis analyse par chromatographie sur échangeur d'ions (auto-analyseur Technicon), nous trouvons pour chacune des préparations la composition en acides aminés reportée Tableau XIII. Ces résultats amènent aux réflexions suivantes :

- Nous voyons que certains rapports d'acides aminés varient énormément (ARG/HIS - ou surtout THR/SER).
- Les chiffres de CYS sont très différents d'un échantillon à l'autre. Mais on ne peut guère se fier aux résultats trouvés, étant donné l'altération de cette molécule au cours de l'hydrolyse, en particulier son oxydation.
- La quantité de MET semble également être entachée d'une erreur par défaut, par oxydation là encore au cours de l'hydrolyse.
- On constate d'autre part sur le tracé de l'enregistrement de la chromatographie une quantité importante d'un acide aminé non classique ou d'une autre molécule réagissant à la ninhydrine. Etant donné son emplacement (juste après la valine), il pourrait s'agir éventuellement de galactosamine ou de mannosamine, ce qui n'est pas en discordance avec la composition en osamines trouvée.
- L'absence d'un colorimètre spécial pour évaluer la coloration donnée par la proline avec la ninhydrine, ne permet pas de donner une valeur très exacte de la quantité en cet acide aminé.

III - RECAPITULATION DES RESULTATS PHYSICO-CHIMIQUES NOUVEAUX

Les préparations obtenues présentent une impureté qui, dans le cas de F 947, a pu être identifiée à de l'albumine. Il semble toutefois que sa faible quantité relative (1 p. mille) nous autorise à donner une première approche de la fiche signalétique.

Dans le cas de la protéine d'origine humaine, nous pouvons avancer un poids moléculaire de 110 000, une copule protidique de 56 p. cent, avec la composition en acides aminés reportée Tableau XIII et dans la copule glucidique les pourcentages de constituants reportés Tableau XII. Nous notons en faisant la somme de l'ensemble un léger excès par rapport à 100 p. cent pour l'ensemble protide-glucide (+ 3,5 p. cent) dû vraisemblablement aux erreurs analytiques et au fait que nous ne tenons pas compte de l'interférence des molécules d'eau nécessaires pour hydrolyser en monomolécules les constituants.

Dans le cas de la protéine d'origine porcine, nous pouvons annoncer un poids moléculaire de 120 000, une copule protidique de 42,8 p. cent avec la composition en acides aminés reportée Tableau XIII. La copule glucidique est moins bien cernée, en raison du manque de matière première.

(*) Nous remercions le Père LOISELET (de la Faculté Française de Médecine et de Pharmacie Saint-Joseph de Beyrouth-Liban) qui a bien voulu déterminer pour nous la composition des acides aminés des deux échantillons.

Les deux protéines diffèrent légèrement entre elles, tout en présentant dans leurs constituants (acides aminés en particulier) un certain parallélisme.

La faible réaction antigène-anticorps ne nous permet pas de conclure à une absence totale de communauté antigénique entre la protéine humaine et la protéine porcine. Il nous faudrait, pour avoir un résultat net, préparer un immunsérum spécifique correspondant à chacune des protéines et faire des réactions croisées (protéine humaine contre sérum antiprotéine de Porc et inversement).

TABLEAU XIII

Composition en acides aminés des préparations F 947 (origine humaine) et F 950 (origine porcine) (en μM d'acide aminé par mg d'échantillon).

	F 947 (N α aminé : 6,5 p. cent	F 950 (N α aminé : 7,4 p. cent
ASP	0,350	0,236
THR	0,238	0,108
SER	0,114	0,135
GLU	0,427	0,261
GLY	0,114	0,122
ALA	0,145	0,153
VAL) Inconnu)	0,540	0,090 0,273
CYS-SH	0,034	0,006
MET	0,008	0,012
ILE	0,109	0,076
LEU	0,230	0,140
TYR	0,121	0,047
PHE	0,121	0,063
LYS	0,184	0,133
HIS	0,049	0,063
ARG	0,011	0,062
PRO	0,200 (?)	0,166 (?)

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DU MODE DE LIAISON

CHAPITRE I

ETUDES EXPERIMENTALES DE LA LIAISON ET DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS

Durant toute la préparation de la glycoprotéine étudiée, nous avons suivi l'enrichissement des fractions obtenues par la mesure de la diminution de l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye.

Au cours de notre travail, nous avons tenté de préciser le mécanisme de ce phénomène pharmacologique.

Nous avons d'autre part mis en évidence la captation de l'histamine par la glycoprotéine étudiée, selon un phénomène que nous qualifierons de physico-chimique. L'évaluation quantitative de la fixation de l'histamine captée est rendue possible par utilisation d'histamine radiomarquée au ^{14}C sur le carbone 2 du cycle imidazole.

Ce sont ces divers résultats que nous exposons après un bref rappel des données déjà connues.

Nous appelons DMA ou Dose Minimale Active le poids minimum de protéine contenant une unité d'activité telle que définie plus haut (tableau des abréviations).

I - DONNEES PHARMACOLOGIQUES CONNUES

Pour une série d'expériences basées sur la technique pharmacologique décrite (Partie II, Chap. 1, I) LEBEL (52) avait pu préciser les points suivants que nous allons résumer :

- La diminution maximale d'activité biologique de l'histamine est de l'ordre de 20 p. cent.
- Le phénomène se produit instantanément.
- Si, pour une concentration fixe en histamine, l'on fait varier la quantité de protéine active dans le bain dans un rapport de 1 à 100 000, la diminution d'activité biologique de l'histamine reste de l'ordre de 20 p. cent.
- Si, en présence d'une concentration fixe en protéine, on met des quantités d'histamine variant dans un rapport de 1 à 100, l'inhibition de la contraction de l'iléon isolé de Cobaye reste d'environ 20 p. cent.
- Si l'on met dans le bain de l'organe et au contact de celui-ci, 1 DMA et 0,2 nM d'histamine/ml de bain, puis que l'on soutire ce bain de l'iléon, on ne retrouve pas de protéine ac-

tive. Par contre si l'on répète la même expérience en remplaçant 1 DMA/ml par une quantité de protéine supérieure à la DMA, on retrouve dans le bain soutiré une quantité de protéine égale à l'excès par rapport à la DMA/ml, c'est-à-dire par rapport à la quantité minimale nécessaire pour provoquer le phénomène pharmacologique.

- Si l'on met en contact dans un bain et par ml, 1 DMA et un iléon n° 1 isolé de Cobaye, puis que l'on enlève l'iléon pour, dans un second temps, ajouter au même bain 0,2 nM/ml d'histamine et un nouvel iléon n° 2 isolé de Cobaye, il n'y a pas de diminution de l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon n° 2. LEBEL en conclut que la protéine s'est fixée sur l'iléon n° 1.

- NOUVELLES DONNEES SUR LE PHENOMENE PHARMACOLOGIQUE

Pour mieux suivre le déroulement du raisonnement, nous exposons pour chaque expérience, le but recherché, sa modalité de réalisation, le résultat obtenu et la discussion en découlant. En effet, chacune de ces expériences repose sur l'essai pharmacologique décrit, seuls diffèrent les éléments introduits. Nous reprenons ensuite, ultérieurement en fin de chapitre, l'ensemble de ces discussions fragmentaires.

A - Nous savons que l'iléon isolé de Cobaye fixe la protéine, en présence de l'histamine nécessaire à l'essai pharmacologique, nous voulons préciser si cette fixation nécessite vraiment ou non la présence d'histamine.

Expérience :

- Nous mettons en présence de l'iléon 1 DMA/ml de protéine active, puis nous soutirons ce bain n° 1.
- Nous rinçons l'iléon avec 10 ml de liquide de Tyrode, qui constitue le bain n° 2.
- Nous déterminons la diminution de l'activité biologique de l'histamine du bain n° 1 : il n'y a pas de diminution décelable par la méthode pharmacologique.
- Nous faisons de même avec le bain n° 2 : il y a une diminution de 15 à 20 p. cent.

Discussion :

La protéine se fixe donc sur l'iléon en absence d'histamine. La valeur de la DMA est sensiblement la même (la différence entre les 20 p. cent de diminution d'activité biologique correspondant à la DMA, et les 15 à 20 p. cent de diminution provoquée par le bain n° 2 semblant être due aux pertes d'échantillons lors des manipulations).

Nous en concluons qu'il n'y a pas, au contact de l'iléon, de changement de la protéine altérant ses propriétés pharmacologiques.

B - Nous voulons alors préciser les modalités de fixation et de libération de la protéine et l'influence en particulier à ce niveau de la présence ou de l'absence de l'histamine.

Expérience :

- Nous mettons au contact de l'iléon et par ml de bain 1 DMA de protéine et 0,2 nM d'histamine. Nous soutirons ce bain n° 1.
- Nous effectuons un premier rinçage avec 5 ml de liquide de Tyrode contenant 0,2 nM/ml d'histamine, nous conservons ce bain n° 2.
- Nous effectuons un nouveau rinçage avec 5 ml de liquide de Tyrode sans histamine. Nous conservons ce bain n° 3.
- Nous procédons alors à une détermination de l'activité pharmacologique de chacun de ces bains.
- Les bains n° 1 et 2 ne provoquent aucune diminution de l'activité biologique de l'histamine. Seul le bain n° 3 montre une diminution de l'activité de l'histamine de 20 p. cent.

Discussion :

La protéine se fixe sur l'iléon en présence d'histamine et reste fixée sur l'iléon si le rinçage de ce dernier est effectué avec un liquide de Tyrode contenant de l'histamine. Par contre, le premier rinçage effectué sans histamine entraîne la libération de la protéine, et ce départ est quantitatif puisque nous retrouvons la diminution maximale (20 p. cent) du phénomène.

C - Chaque fois que nous effectuons une détermination pharmacologique, nous mettons dans le bain contenant l'iléon d'abord la protéine, puis l'histamine. Or, nous savons que les antihistaminiques ne sont actifs que s'ils sont mis au contact de l'iléon avant affusion de l'histamine. Ils ne sont pas actifs si l'on ajoute au bain de l'iléon la somme antihistaminique plus histamine préalablement incubés. Que se passe-t-il si l'on ajoute au bain de l'iléon la somme protéine plus histamine préalablement incubées ?

Expérience :

- Nous réalisons une incubation pendant dix minutes à 37° C de 1 DMA/ml de protéine et 0,2 nM/ml d'histamine dans 5 ml de liquide de Tyrode.
- Nous mettons le liquide d'incubation au contact de l'iléon isolé de Cobaye et mesurons la contraction.
- Il y a une diminution de 20 p. cent par rapport au témoin histamine.

Discussion :

L'incubation préalable n'empêche pas le phénomène qui, de plus, sur le plan quantitatif, reste le même.

D - Nous poussons plus loin la différence avec les anti-histaminiques, nous demandant si la protéine peut avoir une action curative de l'action contracturante de l'histamine sur l'iléon.

Expérience :

- Nous mettons dans le bain de l'iléon 0,2 nm/ml d'histamine et avons une contraction 100 p. cent.
- Nous ajoutons sous un volume négligeable une quantité de protéine active telle que la concentration dans le bain est de 1 DMA/ml.

  La contraction n'est plus que de 80 p. cent.

Discussion :

La protéine a une action curative de l'action contracturante de l'histamine agissant comme si la protéine déplace l'histamine de un cinquième des sites de l'iléon. Elle se différencie donc totalement des anti-histaminiques.

E - Nous nous demandons alors s'il ne peut y avoir interférence de la part de la muqueuse de l'iléon :

- soit par elle-même : si elle fixe l'histamine, elle nous fait faire une erreur par défaut de l'action contracturante d'un bain iléon-histamine ;
- soit par des produits de lyse de la muqueuse ; si ces produits existent et sont doués de l'activité pharmacologique recherchée, ils peuvent :
  . interférer dans nos conclusions quant à la présence, ou non de la protéine dans un bain d'iléon,
  . ou bien ajouter leur action à celle de la protéine étudiée,
  . ou bien nous faire prendre comme contraction 100 p. cent de l'histamine, une contraction qui est déjà diminuée d'un pourcentage x dû à ces produits de lyse.

Expérience :

- Nous faisons un bain n° 1 de liquide de Tyrode dans lequel nous laissons en contact quinze minutes un iléon isolé de Cobaye et 0,2 nM/ml d'histamine. Nous soutirons ce bain n° 1 et mesurons son action contracturante par rapport à un témoin fait dans des conditions normales. Nous trouvons 100 p. cent.
- Nous faisons un bain n° 2 dans lequel nous laissons un iléon isolé de Cobaye pendant quinze minutes. Nous soutirons ce bain n° 2 et mesurons son activité protectrice vis-à-vis de l'action contracturante de l'histamine sur un nouvel iléon : il n'y a pas de pouvoir protecteur.

Discussion :

La muqueuse de l'iléon ne fixe pas d'histamine et la contraction que nous considérons comme 100 p. cent est bien due à la totalité de l'histamine introduite.

Cette même muqueuse ne libère pas de produits de lyse doués de l'activité pharmacologique recherchée : lorsque nous considérons qu'il y a une activité protectrice de 20 p. cent vis-à-vis de l'activité contracturante de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye, nous n'avons aucune interférence de produits actifs autre que la protéine.

Le phénomène observé est bien dû à la seule interaction de la triade : protéine, site récepteur de l'iléon et histamine, et en corollaire, le phénomène pharmacologique ne peut être perçu qu'en présence de cette même triade. Mais nous ne pouvons à ce stade mieux préciser les modalités du phénomène.

F - Nous connaissons mal l'influence de la surface de l'iléon dans le cadre du phénomène pharmacologique. Si celle-ci existe, elle n'a pu jusqu'à présent interférer de façon visible dans les résultats trouvés étant donné la constance de dimension des iléons employés.

Nous voulons voir ici l'importance de ce paramètre de la réaction.

Expérience :

- Nous mettons 3 DMA en présence de 3 iléons. Nous soutirons le bain : il ne présente aucune activité protectrice de l'histamine.
- Nous mettons 3 DMA en présence de 2 iléons. Nous soutirons le bain : il présente une activité protectrice de 20 p. cent de l'activité contractile de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. Donc, il y a 1 DMA dans le bain et les deux iléons n'ont fixé que deux DMA.

Discussion :

Il semble y avoir parallélisme entre nombre d'iléons en expérience et DMA fixée.

Ceci, comme précédemment dit, n'interfère en rien dans les expériences faites car nous utilisons des iléons sensiblement de même surface.

III - DONNEES SUR LE PHENOMENE PHYSICO-CHIMIQUE

Il nous est apparu alors intéressant de voir si l'histamine est captée par la protéine étudiée, en absence d'iléon. Le phénomène pharmacologique n'est plus ici en question. Il nous faut mettre en évidence le phénomène physico-chimique.

DURAND (22) a déjà montré que par incubation de sérum humain normal et d'histamine radiomarquée ^{14}C, on met en évidence par chromatographie de filtration sur Biogel P10 un pic exclu contenant une combinaison histamine-protéine.

C'est à ce mode de séparation par chromatographie sur gel (Séphadex ou Biogel), que nous faisons appel au cours de nos expériences.

Celles-ci sont réalisées avec des préparations enrichies en produit actif sur le plan pharmacologique.

Nous nous heurtons pour l'exposé des modalités d'expériences de leurs résultats et des discussions en découlant aux mêmes difficultés que dans le précédent paragraphe : les expériences mises en jeu reposent sur l'utilisation des mêmes techniques et ne diffèrent entre elles que par les éléments introduits ou par quelques points rapides à exposer. Pour garder le fil directeur de l'objectif poursuivi, nous adoptons le même plan d'exposition que précédemment : but de l'expérience, sa réalisation, ses résultats et la discussion entraînée. Nous reprenons ultérieurement, en fin de chapitre, l'ensemble de ces discussions fragmentaires.

A - Nous désirons tout d'abord mettre nettement en évidence le phénomène.

Expérience :

- Nous prenons divers échantillons protéiques enrichis en principe actif sur le plan pharmacologique. Ils proviennent de sérum humain normal diafiltré sur membrane XM 300 dans le cas des six premières fractions mentionnées Tableau XIV et d'un surnageant de relargage au sulfate d'ammonium 3,6 - pH 7, dans le cas de la dernière fraction F 892.
  (Zone de relargage ne contenant pas la protéine étudiée).
- Ces divers échantillons sont mis à incuber dans 3 ml de liquide de Tyrode, avec un mélange de dichlorhydrate d'histamine radiomarquée ^{14}C et de dichlorhydrate d'histamine froide, selon les modalités exposées Tableau XIV.
- Une chromatographie de filtration sur gel de Séphadex G25 nous permet de séparer la combinaison histamine-protéine (correspondant au pic exclu) de l'histamine libre (pic retardé). Nous lyophilisons la fraction exclue.
- Nous dissolvons 1 mg d'échantillon ainsi obtenu dans 1 ml d'eau distillée, et mesurons la radioactivité β émise. Nous calculons le nombre de nM d'histamine fixées en tenant compte de la dilution isotopique et reportons les résultats Tableau XIV.

Discussion :

1. Les fractions ayant une activité pharmacologique présentent une radioactivité dans le pic exclu. On peut en conclure que nous avons effectivement de l'histamine liée aux protéines. La quantité relative captée apparaît comme très faible si l'on compare histamine incubée, et histamine liée. Il est en réalité impossible de faire un calcul de pourcentage de captation car l'histamine s'adsorbe fortement sur le gel de Séphadex, il doit se produire ainsi un déplacement d'équilibre qui réduit la quantité apparente de l'histamine réellement captée.

On peut cependant contester le phénomène quand on voit qu'une fraction inactive sur le plan pharmacologique, n'a pas semblé capter d'histamine (radioactivité

TABLEAU XIV

Incubation et fixation d'histamine par divers échantillons de protéine

N° expérience	F 881	F 882	F 883	F 884	F 903	F 887	F 892
N° échantillon	F 870	F 870	F 874	F 874	F 874	F 874	F 528 (surnageant 3,6 M)
mg protéine incubés	150	150	150	150	150	150	30
x	0,6 ng	0,6 ng	3 ng	3 ng	3 ng	3 ng	Inactive
Nombre DMA incubées	25×10^7	25×10^7	5×10^7	5×10^7	5×10^7	5×10^7	0
Température d'incubation	22° C	37°2	37° C	22° C	22° C	22° C	22° C
Temps d'incubation	24 h	24 h	24 h	48 h	24 h	24 h	24 h
Quantité d'histamine incubée) Hist. marquée	0,1 µM	0,1 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	0,1 µM	0,1 µM
) Hist. froide	0,1 mM	0,1 mM	0,025 mM	0,025 mM	0,025 mM	0,025 mM	
Nombre de nM d'histamine fixées par mg de produit lyophilisé	3,83	3,18	0,72	0,38	0,82	0,41	0,01

nulle - aux erreurs de comptage ou d'expérience près - au niveau du pic exclu, correspondant aux protéines).

2. Si l'on compare l'incubation de 24 heures (F 883) et de 48 heures (F 884), la quantité d'histamine captée dans le second cas est plus faible. On peut attribuer cette diminution à une dénaturation de la protéine diminuant ses propriétés physiologiques.

3. Nous notons que les protéines plus actives sur le plan pharmacologique (F 881 et F 882) captent plus d'histamine que les protéines moins actives. Nous pouvons donc penser à un certain parallélisme entre phénomène pharmacologique et phénomène physico-chimique.

B - On peut cependant se demander si l'histamine présente dans la fraction protéique exclue par chromatographie sur gel, est véritablement une histamine liée à la protéine, ou bien si ce n'est pas une histamine simplement adsorbée.

Dans le but de vérifier la présence d'une liaison physico-chimique, nous procédons, après une expérience d'incubation analogue à celle exposée précédemment (Partie IV, Chap. 1, III A) au dosage de l'histamine totale et de l'histamine libre dans la fraction exclue.

Expérience :

- Sur les fractions précédemment incubées et soumises à la chromatographie de filtration sur gel, nous procédons au dosage de l'histamine selon trois méthodes :

1.- Détermination de la radioactivité β émise : nous avons ainsi la quantité totale d'histamine présente (libre ou combinée) en tenant compte de la dilution isotopique.

2.- Dosage fluorimétrique à l'autoanalyseur, donc après dialyse : nous avons ainsi la quantité d'histamine libre ou fixée de façon très labile à la protéine.

3.- Détermination de l'activité contracturante sur l'iléon isolé de Cobaye : activité due à l'histamine libre seulement, mais éventuellement entachée d'une erreur par défaut. En effet, la combinaison protéine-histamine peut posséder un pouvoir résiduel de diminution d'activité contracturante sur l'iléon isolé de Cobaye.

Les divers résultats obtenus sont reportés dans le Tableau XV.

Discussion :

Malgré les réserves précédentes, les résultats des dosages d'histamine libre par la technique analytique et par la technique physiologique sont concordants. Les mesures par radioactivité donnent des résultats très différents.

Les quantités d'histamine libre trouvée rapportées à un milligramme de protéine sont extrêmement faibles, de façon absolue, ainsi que de façon relative, quand on les compare aux taux d'histamine totale dosée par radioactivité. La différence entre ces deux valeurs correspond à l'histamine liée à la protéine.

La présence d'histamine libre dans la fraction exclue sur gel de Séphadex G 25, c'est-à-dire dans une fraction contenant des molécules de poids moléculaire supérieur à 5 000, s'explique par la libération d'histamine à partir de la combinaison histamine-protéine, pour respecter l'équilibre de la réaction :

Histamine libre + Protéine $\rightleftharpoons$ Combinaison histamine-protéine.

C - Nous venons de prouver que l'histamine se lie avec la protéine : si nous réalisons une incubation d'une protéine (dont nous connaissons la valeur de la DMA) avec l'histamine, nous savons qu'il y a formation d'une combinaison histamine-protéine. Celle-ci devrait alors avoir un moindre pouvoir protecteur de l'iléon isolé de Cobaye vis-à-vis de l'histamine libre présente dans le bain, puisque tout ou partie des sites de la protéine sont déjà occupés par l'histamine ajoutée au moment de l'incubation.

Expérience :

- Nous préparons la combinaison histamine-protéine à partir d'échantillons de sérum humain enrichis en principe actif par diafiltration sur membrane XM 300. Nous traitons trois fractions actives sur le plan pharmacologique (F1, F2, F3) et une fraction inactive (F4).

L'expérience est réalisée en dissolvant 150 mg de protéine dans 3 ml de liquide de Tyrode et en ajoutant :

0,2 µM de dichlorhydrate d'histamine ^{14}C
0,025 mM de dichlorhydrate d'histamine froide.

Nous laissons incuber 24 heures à 22° C.

La combinaison histamine-protéine est séparée de l'histamine libre par chromatographie sur gel de Séphadex G 25 équilibré en eau distillée. Les fractions sont recueillies sur collecteur de fractions, l'éluat est enregistré en continu à 280 nm, la présence d'histamine radioactive est recherchée sur chaque tube. Nous lyophilisons la fraction correspondant à la superposition d'un clocher protéique et d'un clocher d'histamine (pic exclu).

Nous dissolvons 1 mg de la fraction lyophilisée dans 1 ml d'eau et déterminons la radioactivité β émise. Nous pouvons ainsi calculer, en tenant compte de la dilution isotopique, le nombre de nanomoles d'histamine fixées par milligramme d'échantillon.

Nous procédons ensuite à la détermination de la nouvelle valeur de la DMA par la méthode pharmacologique et nous comparons le nombre de DMA par milligramme de protéine de chaque échantillon avant et après incubation.

Les résultats sont reportés dans le Tableau XVI.

Discussion :

Nous confirmons :

- la captation d'histamine dans le phénomène physico-chimique, puisque nous trouvons une captation d'histamine uniquement dans les échantillons dits "actifs",

TABLEAU XV

nMoles de dichlorhydrate d'histamine présentes par mg de protéine après formation et séparation de la combinaison histamine-protéine

N° des fractions	Histamine dosée par radioactivité	nM Histamine dosée par fluorimétrie à l'auto-analyseur	Histamine dosée sur l'iléon isolé de Cobaye
F 882	3,18	0,06	0,05
F 883	0,72	0,06	0,06
F 884	0,38	0,05	0,08
F 894	0,18	$<$ 0,05	0,08
F 903	0,82	0,05	0,04

TABLEAU XVI

Fixation d'histamine par la protéine - Comparaison du nombre de DMA par milligramme de protéine avant et après incubation

	F 1	F 2	F 3	F 4
$1/X_0$	1×10^6	$1,6 \times 10^6$	$0,03 \times 10^6$	Inactive
		Incubation avec histamine		
nanomoles d'histamine fixées par mg de protéine	0,33	0,53	0,29	0,01
$1/X_1$	$1,6 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$0,05 \times 10^5$	Inactive
Coefficient de diminution d'activité	5,5	4,8	6	-

$1/X_{(-)}$ = Nombre de DMA par milligramme de protéine de l'échantillon.

- le parallélisme entre phénomène pharmacologique et phénomène physico-chimique.

Nous constatons une diminution d'activité après incubation, comme si l'histamine alors fixée masquait sur la protéine un certain nombre de sites impliqués dans l'action protectrice lors du phénomène pharmacologique. Toutefois, il reste une activité résiduelle notable, surtout quand nous la comparons à l'absence totale d'activité de la fraction témoin inactive F 4 : malgré l'excès d'histamine, l'incubation n'a permis la fixation de celle-ci que sur une partie des sites récepteurs de la protéine.

Deux hypothèses permettent d'expliquer ces résultats :

- les sites impliqués dans le phénomène pharmacologique et dans le phénomène physico-chimique sont différents,
- l'affinité pour l'histamine est différente dans les deux phénomènes. Nous tenterons ultérieurement, dans le chapitre II, de voir si cette hypothèse est fondée.

D - Jusqu'ici, nous avons donné la preuve expérimentale de la création d'une combinaison histamine-protéine par incubation d'un échantillon protéique "actif" avec de l'histamine. Par méthode pharmacologique, on ne trouve alors que très peu d'histamine libre (Partie IV, Chap. 1, II B), l'histamine est en effet en majeure partie liée à la protéine.

Nous tentons ici de libérer quantitativement cette histamine liée.

Expérience :

- Nous reprenons les fractions précédentes F 1, F 2, F 3, incubées avec de l'histamine, exclues par chromatographie sur gel de Séphadex G 25 et lyophilisées de la précédente expérience (Partie IV, Chap. 1, II C). Nous évaluons :

  . l'histamine totale par détermination de la radioactivité β.
  . l'histamine libre par la méthode pharmacologique.

L'histamine liée est ensuite libérée par hydrolyse chlorhydrique qui, dans les conditions choisies, respecte l'intégrité de la molécule d'histamine, tout en hydrolysant totalement la protéine. Des échantillons de 10 mg de chacune des fractions lyophilisées sont soumises à l'action hydrolysante de 5 ml d'acide chlorhydrique 6 N, sous vide, à 100° C, pendant 24 heures. L'acide chlorhydrique est éliminé par évaporation au bain de sable. Le résidu sec est dissous dans 5 ml de liquide de Tyrode. Le pH de la solution obtenue est de 7,40.

Nous effectuons un dosage de l'histamine libre sur cette solution, par la méthode pharmacologique.

Le Tableau XVII permet de comparer le nombre de nanoMoles de dichlorhydrate d'histamine présentes par milligrammes de fraction :

- d'une part avant hydrolyse :
  . soit sous forme combinée, plus libre (radioactivité β),
  . soit sous forme libre (méthode pharmacologique) :

Les résultats présentant des erreurs par défaut, du fait du pouvoir protecteur résiduel vis-à-vis de l'histamine de la molécule considérée ;

- d'autre part après hydrolyse :
  sous forme libre (méthode pharmacologique), sachant qu'ici il n'y a pas d'erreur par défaut puisque toute la molécule protéique est hydrolysée.

Discussion :

- Avant hydrolyse de la combinaison histamine-protéine obtenue par incubation et séparée par exclusion sur gel de Séphadex G 25, nous notons quand même la présence d'une quantité d'histamine libre. Nous en expliquons la présence :

  . par la nécessité de respecter l'équilibre :
  Histamine libre + protéine $\rightleftharpoons$ Combinaison Histamine-Protéine,

  . et par la libération d'histamine liée de façon suffisamment labile dans la combinaison formée, pour s'en détacher au cours des diverses manipulations effectuées.

- L'hydrolyse chlorhydrique est suffisamment forte pour rompre toutes les liaisons, même covalentes, susceptibles d'exister entre protéine et histamine. Ceci explique que la quantité d'histamine libre, trouvée après hydrolyse, soit très proche, aux erreurs dues aux manipulations près, des quantités d'histamine totale trouvées avant hydrolyse.

E - Nous avons fait allusion précédemment déjà (Partie IV, Chap. 1, III D) à de l'histamine liée de façon labile à la protéine. La méthode d'hydrolyse chlorhydrique employée pour libérer l'histamine de la combinaison protéine-histamine est trop brutale pour discerner entre liaisons labiles et liaisons plus solides.

Pour mieux faire la part entre les deux sortes de liaisons possibles, nous faisons appel à la diafiltration sur une membrane Amicon PM 30 dont les capacités de rétention lui permettent de retenir la protéine étudiée, alors qu'elle laisse filtrer l'histamine libre.

Dans un premier temps, nous étudions la diafiltration sur cette membrane d'une molécule aisément diffusible et n'ayant aucune interréaction avec la membrane. Nous faisons appel au chlorure de sodium dont nous suivons la diafiltration par dosage du chlore dans le diafiltrat (voir technique et théorie, Partie II, Chap. 5). Nous étudions de même la diafiltration d'histamine en suivant sa présence par radioactivité. La technique utilisée étant celle du "Wash out", nous dressons pour chacune de ces molécules la courbe représentative de la variation de $\frac{Co}{C}$ en fonction de Ve (Fig. 15 - 17) et de C en fonction de V (Fig. 16 - 17) et nous les comparons.

Nous en déduisons que l'histamine ne se lie pas à la membrane PM 30 (volume mort V' semblable dans les deux cas). Cependant, dans le cas de l'histamine, la pente de la droite est légèrement plus faible et le volume total d'éluant nécessaire pour la diafiltration totale de la molécule est légèrement plus élevé que dans le cas du chlorure de sodium : l'histamine est légèrement retenue par la membrane.

TABLEAU XVII

Comparaison du nombre de nanoMoles de dichlorhydrate d'histamine présentes par milligramme de fractions avant et après leur hydrolyse chlorhydrique

N° des fractions	Avant hydrolyse		Après hydrolyse
	nM Histamine totale (dosée par radioactivité)	nM Histamine libre (dosée par méthode pharmacologique)	nM Histamine libre (dosée par méthode pharmacologique)
F 1	0,33	0,16	0,35
F 2	0,53	0,10	0,41
F 3	0,29	0,10	0,31

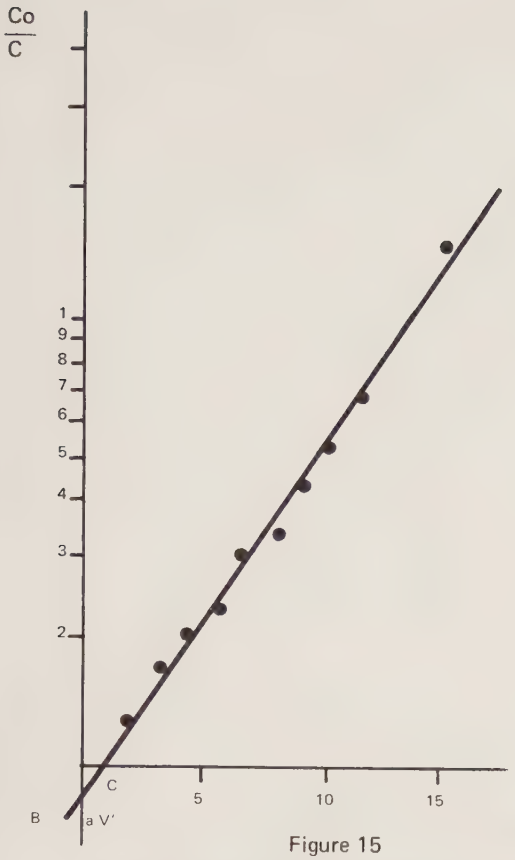


Figure 15

Expression de la diafiltration du chlorure de sodium

(Co en f. de V)

C

Fig. 15 -

Expression de la diafiltration du chlorure de sodium

($\frac{Co}{C}$ en f. de V)

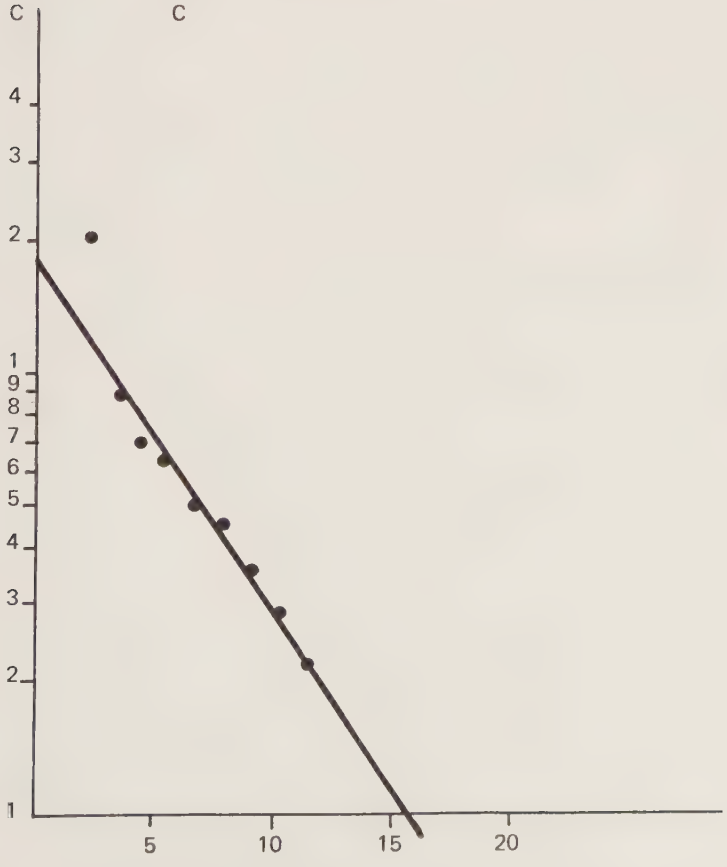


Figure 16

Expression de la diafiltration du chlorure de Sodium

Fig. 16 -

Expression de la diafiltration du chlorure de sodium

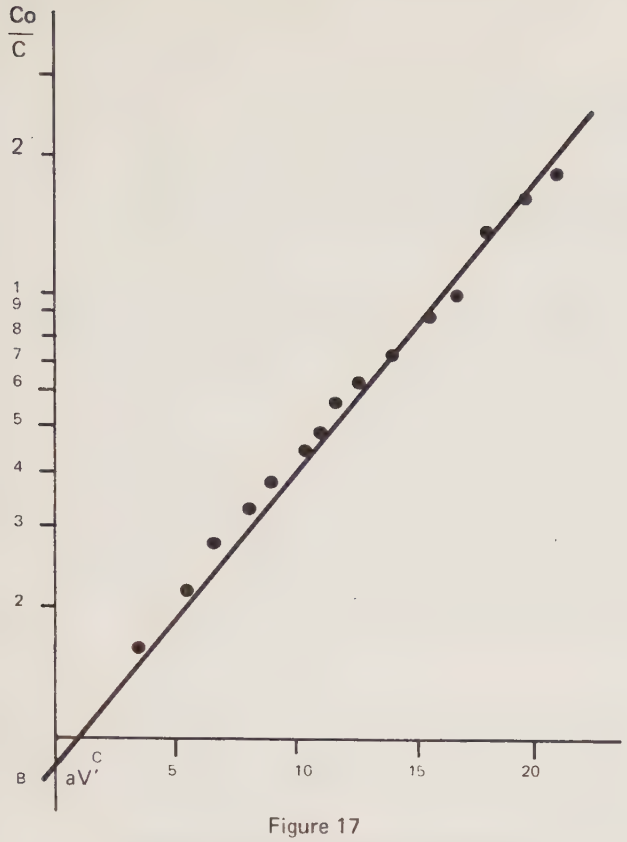


Figure 17
Expression de la diafiltration de l'histamine
($\frac{Co}{C}$ en f. de V)

Fig. 17 -
Expression de la diafiltration de l'histamine
($\frac{Co}{C}$ en f. de V)

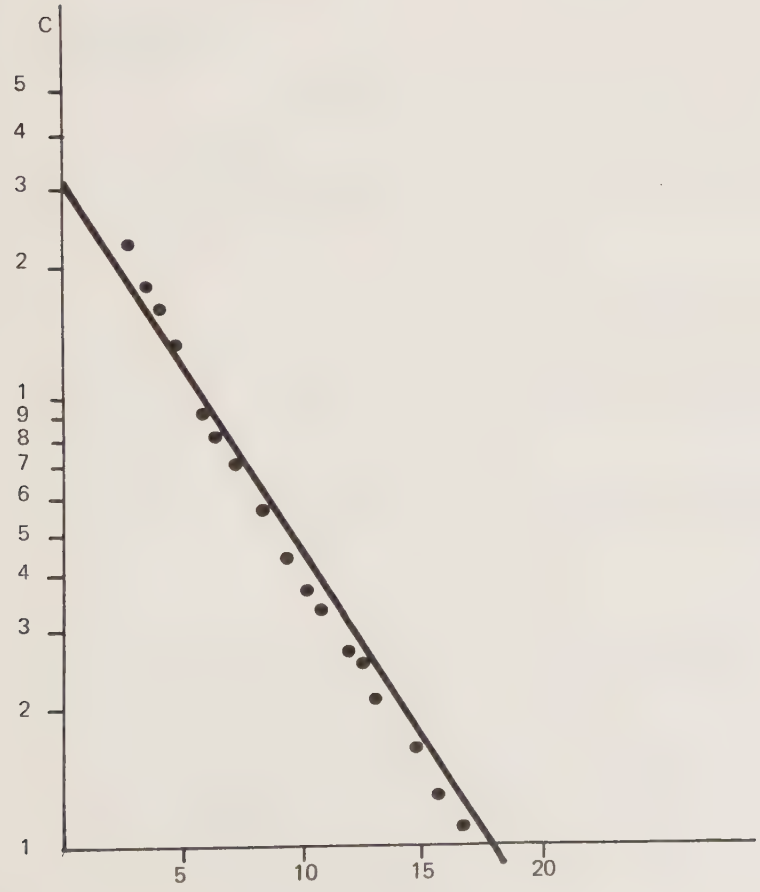


Figure 18
Expression de la diafiltration de l'histamine

Fig. 18 -
Expression de la diafiltration de l'histamine

Dans un second temps, nous procédons à l'expérience proprement dite :

(a) - Nous faisons incuber des fractions protéiques d'activité connue avec de l'histamine ^{14}C. Nous mesurons par radioactivité β la quantité d'histamine fixée. L'activité de la combinaison obtenue est recherchée par la méthode pharmacologique.

(b) - Les préparations contenant la combinaison histamine-protéine en proportions connues sont ensuite soumises à une diafiltration sur membrane PM 30 pour éliminer l'histamine ici de façon labile.

Nous procédons à une nouvelle détermination d'activité pharmacologique.

Une partie des sites histaminophiles de la protéine est de ce fait débarrassée d'histamine. Ces sites sont donc prêts à permettre à la protéine de protéger l'iléon isolé de Cobaye contre l'action contracturante de l'histamine du bain d'expérience, de façon plus importante que lorsque ces mêmes sites sont occupés par l'histamine, avant diafiltration. Ceci doit s'objectiver par une augmentation du nombre d'unités d'activité pharmacologique (DMA) par milligramme de produit.

(c) - Si des sites sont libérés sur la protéine, ils doivent pouvoir à nouveau fixer de l'histamine par une nouvelle incubation. La combinaison alors formée est soumise à une détermination de l'activité pharmacologique. Ayant moins de sites disponibles pour capter l'histamine, l'échantillon doit présenter une action protectrice de l'iléon isolé de Cobaye moindre et donc contenir un nombre moindre d'unités d'activité pharmacologique par milligramme de produit.

Expérience :

Nous prenons trois échantillons protéiques :

- l'un (F 4) est dénué d'activité pharmacologique,
- les deux autres (F 5 - F 6) présentent une activité pharmacologique connue (Tableau XVIII).

(a) - Chaque fraction est traitée comme décrit (Partie IV, Chap. 1, II C). Sur chaque fraction lyophilisée nous déterminons :

. la quantité totale d'histamine présente par mesure de la radioactivité β émise après dissolution d'1 mg de la fraction obtenue dans 1 ml d'eau distillée) ;

. le nombre d'unités d'activités pharmacologiques par milligramme de produit ($1/X_1$).

(b) - La diafiltration sur membrane est effectuée après dissolution de 6 mg de la combinaison obtenue en (a) dans 6 ml de liquide de Tyrode.

La solution est introduite dans une cellule Amicon 8 MC, munie d'une membrane PM 30 de 25 mm de diamètre. La diafiltration est réalisée par passage de 60 ml de liquide de Tyrode avec agitation et sous une pression de 0,7 bar. Le diafiltrat est recueilli par fractions de 2 ml dans un collecteur de fractions. La diafiltration de l'histamine est suivie par mesure de la radioactivité β de 1 ml de chaque tube.

La quantité d'histamine retenue est mesurée sur 1 ml du volume retenu.

Sur ce même retenu de diafiltration, contenant la combinaison histamine-protéine, nous procédons à une nouvelle détermination de l'activité pharmacologique ($1/X_2$).

(c) - Nous procédons à une incubation avec de l'histamine selon la méthode décrite (Partie IV, Chap. 1, II C) en respectant les mêmes proportions de chaque réactif.

Nous déterminons :

. par radioactivité β , la quantité totale d'histamine présente par milligramme de protéine,

. par l'essai pharmacologique, le nombre d'unités d'activité par milligramme de produit ($1/X_3$).

Les résultats de cette expérience sont reportés sur le Tableau XVIII.

Discussion :

(a) - Comme nous l'avions déjà vu précédemment, l'incubation de la protéine avec l'histamine provoque l'occupation d'une partie des sites de la protéine et entraîne une diminution de l'activité pharmacologique de celle-ci.

(b) - La diafiltration permet le déplacement de tout (F 5) ou partie (F 6) de l'histamine fixée précédemment. Cette libération des sites de la protéine lui restaure tout (F 5) ou partie (F 6) de la protection vis-à-vis de l'action contracturante de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. Ceci est objectivé par le nombre de DMA par milligramme de fraction.

(c) - Ces sites précédemment libérés par diafiltration sont susceptibles de fixer à nouveau l'histamine par incubation ; ce qui, aux erreurs d'expérience près, fait diminuer à nouveau le nombre de DMA par milligramme de fraction jusqu'à la valeur trouvée sur la préparation de départ (a).

La protéine ne semble pas, au cours de la dialyse, avoir subi de dénaturation susceptible de révéler des sites jusque là masqués et donc silencieux.

Par contre, il semble exister sur la protéine un certain nombre de sites susceptibles de fixer de façon labile l'histamine. Plus la protéine fixe d'histamine, moins grande est l'activité protectrice de la préparation vis-à-vis de l'action contracturante de l'histamine dans le phénomène pharmacologique.

F - Cette propriété de la protéine nous amène à préciser l'un des points lors du phénomène pharmacologique. La fixation d'histamine sur la protéine par incubation entraîne une diminution de son activité pharmacologique et donc une augmentation de la valeur de la DMA (2) par rapport à celle de la protéine initiale : DMA (1).

$$\text{DMA (1)} < \text{DMA (2)}$$

TABLEAU XVIII

Influence de la diafiltration à travers une membrane PM 30 sur la combinaison Histamine-Protéine

	N° des fractions	F 4	F 5	F 6
	$1/X_{(0)}$	Inactif	$0,33 \times 10^6$	16×10^6
	Incubation			
(a)	(nanoMoles de dichlorhydrate d'histamine (présente par mg de fraction	0,01	0,60	0,18
	($1/X_1$	Inactif	$0,16 \times 10^6$	1×10^6
	Diafiltration sur PM 30			
(b)	(nanoMoles de dichlorhydrate d'histamine (retenue par mg de fraction	0,001	0,26	0,03
	($1/X_2$	Inactif	$0,33 \times 10^6$	3×10^6
	Incubation			
(c)	(nanoMoles de dichlorhydrate d'histamine (présenie par mg de fraction	0,01	0,50	0,21
	($1/X_3$	Inactif	$0,10 \times 10^6$	$0,80 \times 10^6$

$1/X_{(-)}$ = Nombre de doses minimales actives (DMA) par milligramme de produit lyophilisé.

Nous nous demandons si ceci correspond :

- soit au fait que DMA (1) se fixe sur l'iléon et que la quantité de protéine correspondant à la différence entre DMA (2) et DMA (1) est dans le bain. Pour la détecter, nous pouvons prendre le bain de l'expérience, déplacer par diafiltration l'histamine fixée de façon labile sur le bain, et vérifier par la méthode pharmacologique que la protéine ainsi récupérée est active.

- soit au fait que l'ensemble DMA (1) + DMA (2) se fixe sur l'iléon, mais seule DMA (1) étant fonctionnelle vis-à-vis du phénomène pharmacologique. Nous ne retrouvons plus DMA (2) dans le liquide du bain. L'ensemble DMA (2) + DMA (1) est dans le liquide de rinçage sans histamine de l'iléon. En diafiltrant celui-ci, nous éliminons l'histamine liée de façon labile.

Si la protéine est présente nous retrouvons, dans le cadre d'un essai pharmacologique, DMA (1) comme valeur de la dose minimale active pour la protéine.

Expérience :

- Nous prenons une préparation enrichie F 875, dont la DMA (1) est de 0,6 ng. Après incubation avec du dichlorhydrate d'histamine, la préparation obtenue (F 948) présente une DMA (2) de 3 ng. Le coefficient d'appauvrissement est de 5.

- Nous réalisons trois essais pharmacologiques avec F 948 à la dose de 1 DMA (2)/ml de bain. Chaque fois nous soutirons le bain. Nous rinçons avec du liquide de Tyrode. Nous conservons liquides du bain d'une part, et liquides de rinçage d'autre part.

- L'ensemble des liquides de bain est soumis à une diafiltration sur membrane PM 30 par 10 volumes de liquide de Tyrode, puis ultrafiltré jusqu'à un volume de 9 ml.

  L'ensemble des liquides de rinçage est traité de la même manière.

- L'ultrafiltrat des liquides du bain est soumis à l'essai pharmacologique.

  Nous trouvons sensiblement 12 DMA dans le liquide de bain (correspondant à trois expériences avec 1 DMA chacune) - nous constatons que pour 1 DMA (2) mise en expérience, nous trouvons 4 DMA après diafiltration. Nous émettons l'hypothèse qu'1 DMA se fixe sur l'iléon, tandis que la différence entre DMA (2) et DMA (1) reste dans le bain. Par diafiltration, nous révélons l'activité de cette protéine restée dans le bain, c'est à cette activité révélée que correspondent les 4 DMA trouvées. Les méthodes de dosage des protides ne sont pas assez sensibles pour vérifier que ces 4 DMA correspondent au taux de protides de DMA (1).

G - Des conclusions précédentes, nous pouvons penser qu'un sérum contenant un plus grand nombre d'unités d'activité pharmacologique qu'un autre, peut être :

- soit un sérum plus riche en protéine responsable de l'activité étudiée,
- soit un sérum possédant la même quantité de protéine, mais celle-ci différant de celle

du plasma moins actif par la présence d'un plus grand nombre de sites libres capables de fixer l'histamine.

Or, LABORDE et Al. (47) ont montré que les sérums de sujets allergiques, contrairement aux sérums de sujets normaux, ne modifient pas l'action contracturante de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye.

Est-ce que les sérums de sujets allergiques sont dépourvus de la protéine étudiée, ou bien celle-ci est-elle présente, mais ses sites sont-ils saturés par de l'histamine ?

Pour infirmer ou confirmer cette dernière hypothèse, nous faisons une étude comparative de l'influence de la diafiltration à travers une membrane XM 100 A, sur deux types de sérums humains :

- Le premier provient d'un sujet allergique, ne présente aucune activité révélable par la méthode pharmacologique ;
- Le second possède l'activité, révélée par la méthode pharmacologique, de diminuer de 20 p. cent l'action contracturante de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye.

Expérience :

Nous prenons deux échantillons de sérum, l'un (F 7) est un sérum de malade allergique, l'autre (F 8) est un sérum humain normal.

Chaque échantillon, de 6 ml, est introduit dans une cellule Amicon 8 MC, munie d'une membrane XM 100 A, de 25 mm de diamètre. La diafiltration est réalisée par passage de 60 ml de liquide de Tyrode, sous agitation et sous pression de 0,7 bar.

Chaque fraction retenue est recueillie, lyophilisée et soumise à l'essai pharmacologique.

Les résultats sont reportés Tableau XIX.

Discussion :

En préliminaire, il est à remarquer que, lorsque nous parlons de fraction inactive, cela signifie que la première concentration en protéine de l'échantillon essayé, soit 30×10^3 ng/ml dans le bain, ne provoque aucune diminution de l'action contracturante de l'histamine. Par conséquence 1/X (nombre d'unités X ou de DMA en ng par milligramme de protéine) est largement inférieur à :

$$1/X = \frac{1 \times 10^6}{30 \times 10^3} \quad \text{soit } 33$$

Après diafiltration sur membrane XM 100 A, le sérum humain normal montre un enrichissement de 666 fois alors que dans les mêmes conditions, le sérum de malade allergique ne présente toujours aucune activité.

Nous pouvons en conclure que dans le cas du sérum allergique étudié, il n'y a pas eu de déplacement sensible d'histamine éventuellement combinée à une protéine active, comme nous l'avions vu dans le cas d'un sérum normal.

TABLEAU XIX

Comparaison des activités pharmacologiques avant et après passage sur membrane XM 100 A pour deux sérums, l'un de malade allergique, l'autre normal

	F 7 (Sérum allergique)	F 8 (Sérum normal)
$1/X_0$	Inactif ($<<$ 33)	$0,5 \times 10^3$
Passage sur membrane XM 100 A		
$1/X_1$	Inactif ($<<$ 33)	333×10^3

1/X = Nombre de DMA (dosa minimale active) par milligramme de protéine

Ceci nous amène à penser que chez les malades allergiques, la diminution de la captation de l'histamine est due :

- soit à l'absence totale de la protéine,

- soit, si cette molécule est présente, à l'absence de sites actifs fonctionnels.

IV – CONCLUSIONS GENERALES DE CE CHAPITRE

Nous savons maintenant que, dans le cadre du phénomène pharmacologique, la protéine "active" se fixe sur l'iléon, dont elle ne se détache qu'en l'absence d'histamine.

Pour avoir révélation d'activité, il faut la présence d'iléon, d'histamine et de protéine.

D'autre part, une protéine active sur l'essai pharmacologique, mise en présence d'histamine, se combine à une partie de celle-ci. Ceci entraîne une diminution de l'activité pharmacologique de la protéine. Il persiste cependant une activité résiduelle, quelle que soit la quantité (en valeur relative ou en valeur absolue) d'histamine libre présente.

Si on traite la combinaison histamine-protéine par une méthode aussi brutale que l'hydrolyse chlorhydrique, on doit retrouver la totalité de l'histamine fixée sur la protéine. Mais des méthodes plus douces, comme la diafiltration sur membrane à seuil de rétention adapté, permettent de libérer une partie de l'histamine fixée sur la protéine par incubation. Il y a alors augmentation de l'activité protectrice vis-à-vis de l'action de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye.

Ces résultats semblent indiquer que s'il existe, comme nous venons de le prouver, un parallélisme certain entre les deux phénomènes, physico-chimique et pharmacologique, il n'y a pas identité : nous sommes en présence de deux phénomènes différents, mais interférant entre eux.

Ces remarques nous ont amenés à essayer de comparer l'un et l'autre.

CHAPITRE II

COMPARAISON DES PHENOMENES PHARMACOLOGIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE

Dans une première approche, nous avons réalisé une comparaison expérimentale, puis nous avons fait une tentative de quantification.

I - RECHERCHE D'UNE COMBINAISON HISTAMINE-PROTEINE EXISTANT DANS LE CADRE DU PHENOMENE PHARMACOLOGIQUE

Dans l'expérience pharmacologique, l'activité de l'histamine présente dans le bain est diminuée de 20 p. cent et nous savons que la DMA (dose minimale active) est le poids minimum de protéine capable de provoquer cette diminution dans les conditions précédemment décrites de cette détermination (voir Partie II, Chap. 1).

Donc, l'histamine dissimulée ne se trouve plus sous forme libre et, grâce à la protéine fixée sur l'iléon, son action contracturante ne s'exerce plus sur celui-ci.

Nous avons vu précédemment (Partie IV, Chap. I, II B) que la protéine fixée sur l'iléon est libérée par le premier bain de rinçage sans histamine.

En travaillant avec une combinaison protéine-histamine radiomarquée ^{14}C, nous tentons de localiser la combinaison formée : est-elle dans le premier bain de l'expérience, ou bien dans le bain de rinçage ?

Expérience :

(1)- Nous effectuons plusieurs séries de trois expériences, avec successivement pour chaque série : 1 - 10 - 100 - 1 000 et 10 000 DMA de protéine par ml de bain.

- Chaque bain d'iléon a un volume de 5 ml.
- Nous utilisons 1 nM d'histamine ^{14}C pour chaque bain.
- Chaque série de trois expériences nous fournit, après avoir soutiré chaque bain à la seringue, 3 x 5 ml soit 15 ml de liquide de Tyrode de bain pour chaque série de DMA essayée.

Chacun de ces 15 ml correspondant à une série homogène est lyophilisé puis dis-

sous dans 2 ml d'eau distillée et soumis à une chromatographie de filtration sur Biogel P 10. L'élution de l'histamine est suivie par mesure de la radioactivité β émise.

- Après chaque essai, l'iléon utilisé est rincé avec 10 ml de liquide de Tyrode jusqu'à décontraction totale. Chaque série de 3 expériences nous donne donc 30 ml de liquide de rinçage qui sont dialysés (pour éliminer histamine libre et histamine liée de façon labile) puis lyophilisés.
- Nous faisons un témoin en traitant dans chaque cas les mêmes quantités de liquide de Tyrode de la même manière que dans l'expérience, pour vérifier la non interférence des fortes concentrations salines obtenues sur le phénomène pharmacologique.

(2)-

- Après chromatographie sur Biogel P 10 des liquides de bain, nous recherchons dans chaque série homogène la présence de radioactivité β dans les éluats dont le Ve/Vo correspond à celui des molécules exclues. Dans aucune série (1, 10, 100, 1 000 ou 10 000 DMA), nous ne mettons en évidence la présence de combinaison histamine-protéine.
- Chaque série homogène de rinçage est soumise à l'essai pharmacologique. Nous retrouvons sensiblement 3 DMA pour chaque série de 3 expériences, que les séries correspondent à 1, 10, 100, 1 000 ou 10 000 DMA dans le bain.
- Les témoins faits avec du liquide de Tyrode seul montrent qu'il n'y a pas interférence des concentrations salines présentes.

Discussion :

Nous vérifions ainsi que, lors de la détermination pharmacologique de l'activité d'une protéine, celle-ci reste fixée sur l'iléon pendant la première partie de l'expérience.

Ce n'est que lors de la seconde partie, le rinçage avec du liquide de Tyrode sans histamine, que la protéine est libérée de l'iléon.

Quelle que soit la quantité de protéine mise au départ (1, 10, 100, 1 000 ou 10 000 DMA dans le bain), nous ne retrouvons que 3 DMA par série de 3 essais. Malgré un large excès de protéine, seule 1 DMA se fixe sur l'iléon en présence d'histamine.

Nous ne pouvons mettre en évidence l'existence d'une combinaison protéine-histamine. N'existe-t-elle pas dans le phénomène pharmacologique ?

II - ESSAI DE FORMATION DE LA COMBINAISON HISTAMINE-PROTEINE EN SE PLACANT DANS LES MEMES RAPPORTS DE CONCENTRATION QUE POUR LES ESSAIS PHARMACOLOGIQUES.

Dans les précédentes expériences étudiant le phénomène physico-chimique, nous avions fait incuber de larges excès de protéine avec de l'histamine.

Nous faisons maintenant incuber protéine et histamine mais cette fois dans les mêmes rapports de concentration que ceux réalisés dans le cadre de l'essai pharmacologique. Nous cherchons à mettre en évidence par chromatographie d'exclusion sur gel l'existence d'une combinaison histamine-protéine.

Expérience :

Nous réalisons une série d'incubation entre protéine et histamine ^{14}C.

- Les quantités de protéine sont calculées de manière à correspondre à 1, 10, 50, 100, 500, 1 000 DMA/ml.
- La quantité d'histamine, toujours la même dans chaque expérience, est calculée de manière à reproduire les conditions expérimentales de l'essai pharmacologique : 0,2 nM/ml, tout en ayant un nombre de DPM permettant de réaliser une mesure satisfaisante de radioactivité sur la fraction contenant la combinaison histamine-protéine.

L'incubation est réalisée dans 2 ml de liquide de Tyrode, à 37° C et pendant quinze minutes.

Puis l'échantillon est soumis à une chromatographie sur gel de Séphadex G 25. Nous recueillons la fraction dont le volume d'élution correspond au volume mort de la colonne et nous faisons une détermination de la radioactivité β émise. Nous vérifions l'élution de l'histamine libre au niveau d'élution des petites molécules.

Dans aucune expérience, nous ne retrouvons une quantité d'histamine décelable au niveau du volume d'éluat correspondant aux protéines exclues par chromatographie. Par contre, nous retrouvons de l'histamine libre au volume d'élution des petites molécules.

Discussion :

Devant ce résultat négatif, nous cherchons les erreurs expérimentales qui auraient pu nous amener soit à nous masquer la présence de la combinaison histamine-protéine, soit à ne pas être dans de bonnes conditions pour obtenir la dite combinaison.

Nous pouvons penser à un nombre de DPM insuffisant. Mais nous avons tenu compte du fait que 20 p. cent au maximum de l'histamine totale introduite est captée dans le phénomène pharmacologique, et que cette quantité est répartie sur la totalité du volume d'élution correspondant à la fraction exclue par chromatographie sur gel.

D'autre part, nous vérifions l'activité spécifique de la protéine.

Il nous reste à envisager une seconde éventualité : pouvons-nous ne pas être dans de bonne condition pour que la combinaison recherchée se forme ?

Le temps d'incubation (quinze minutes), la température (37° C) ont précédemment permis la formation de la combinaison histamine-protéine.

La seule explication plausible est que, dans le cas du phénomène pharmacologique, l'affinité présidant au masquage de l'histamine est supérieure à l'affinité de la protéine pour l'histamine dans le cas du phénomène physico-chimique.

Nous allons maintenant chercher à mesurer ces affinités et les facteurs impliqués dans les réactions étudiées.

III - AFFINITE DE LA PROTEINE POUR L'HISTAMINE DANS LE CADRE DU PHENOMENE PHYSICO-CHIMIQUE.

Nous utilisons, pour déterminer cette constante, la chromatographie sur gel de Séphadex G 25 selon la méthode préconisée par MUDD et MANN (65).

Comme dans l'équilibre de dialyse, nous nous basons sur la loi d'Action de Masse. Mais la méthode choisie permet de mener l'expérience à température ambiante et de façon suffisamment rapide pour ne pas craindre la dénaturation de la protéine.

Nous réalisons une incubation de la protéine avec de l'histamine dans du liquide de Tyrode, puis nous soumettons l'ensemble à une chromatographie sur gel de Séphadex G 25, préalablement équilibré en liquide de Tyrode et sur fond d'histamine à concentration $[H]$.

Au fur et à mesure que la protéine se déplace le long de la colonne, elle s'équilibre avec l'histamine à une concentration $[H]$. Au niveau d'élution d'une molécule de protéine exclue de la colonne, la concentration totale d'histamine $[Ht]$ dépasse $[H]$ de la quantité $[HP]$ liée à la protéine. Puis, la concentration d'histamine redevient celle du fond d'histamine, avant d'augmenter à nouveau au moment du volume d'élution d'une petite molécule, c'est-à-dire au moment de l'élution de l'histamine libre (excès de l'histamine introduite avec l'essai, par rapport à la quantité totale liée à la protéine).

Nous postulons pour ce calcul que la réaction histamine-protéine se fait molécule à molécule. Au cas où ceci serait erroné, nous obtiendrions la constante de dissociation à un coefficient près.

Nous pouvons écrire :

$$[HP] = [H_t] - [H]$$

où : HP = combinaison histamine-protéine,
H_t = histamine totale,
H = histamine libre

$$[P] = [P_t] - [HP]$$

où : P = protéine libre
P_t = protéine totale

Nous calculons chacun des termes de l'équation permettant d'obtenir la valeur de la constante de dissociation. Appelons K_1 cette constante dans le cadre du phénomène physico-chimique :

$$K_1 = \frac{[P] \times [H]}{[HP]}$$

Nous recueillons l'éluat de chromatographie au niveau d'exclusion des molécules de protéines. Dans chaque tube :

$[P_t]$ est dosé,

$[H_t]$ est déterminé par radioactivité β émise par l'histamine ^{14}C

$[H]$ correspond à la concentration molaire de ce que nous appelons le fond d'histamine ; c'est-à-dire la concentration de la solution éluante équilibrée en histamine.

Expérience :

Nous réalisons une incubation de 6 mg d'un échantillon de protéine (considérée comme pure selon les critères définis) avec 10 nM d'histamine ^{14}C dans 1 ml de liquide de Tyrode pendant 15 minutes à 37° C.

L'échantillon est ensuite soumis à une chromatographie de filtration sur gel de Séphadex G 25 équilibré en liquide de Tyrode contenant 40 nM/l d'histamine ^{14}C.

L'éluat est recueilli sur collecteur de fractions par volume de 2 ml. Chacun des tubes correspondant à la zone d'élution des molécules exclues est soumis à l'analyse suivante :

- dosage des protéines par la méthode de Lowry, ce qui donne $[P_t]$
- dosage de l'histamine par radioactivité β ce qui donne $[H_t]$

La concentration en histamine dans les tubes avant ceux correspondant au volume mort de la colonne, permet de connaître $[H]$ ou bruit de fond d'histamine tel que nous l'avons défini plus haut.

Résultats :

Nous faisons la détermination sur quatre tubes et nous trouvons comme valeur de K_1 en M/l

$$K_1 = 1,85 \pm 0,05 \times 10^{-6}$$

Discussion :

Au coefficient d'erreur près, que protéine et histamine réagissent molécule à molécule, nous pouvons dire que la valeur de la constante de dissociation K_1 est de $1,85 \pm 0,05 \times 10^{-6}$ M entre protéine et histamine dans le cadre du phénomène physico-chimique. Nous l'appellerons K_1.

Elle nous montre une affinité de l'ordre de $0,84 \times 10^6$.

IV - ESSAI DE DETERMINATION DE LA CONSTANTE D'ASSOCIATION PRESIDANT AU AU PHENOMENE PHARMACOLOGIQUE.

Jusqu'à présent, il a été considéré que la captation de l'histamine par la protéine (histaminopexie) traduisait le phénomène pharmacologique. Dans ce cas, on doit trouver, dans le cadre de ce phénomène, une constante d'association entre protéine et histamine, comparable à celle que nous avons trouvée dans le cadre du phénomène physico-chimique.

Nous savons que le phénomène est maximal lorsque toute la combinaison possible est formée, ce qui s'objective par une diminution de 20 p. cent de l'action contracturante de l'histamine.

Appelons K_2 la constante de dissociation cherchée.

Comme dans le paragraphe précédent, nous postulons que la réaction se fait molécule à molécule. Nous pouvons dire que la loi d'action de masse s'applique au phénomène, mais ici nous devons reprendre les paramètres de façon un peu différente de précédemment (Partie IV, Chap. 2, III).

$$K_2 = \frac{[H \times P]}{[HP]}$$

où : H = histamine libre,
P = protéine libre,
HP = combinaison histamine-protéine.

Or

$$[H] = [H_t] - [HP]$$

$[H_t]$ = histamine totale

$$K_2 = \frac{\left[[H_t] - [HP]\right] \times [P]}{(HP)}$$

$$= \left[\frac{[H_t]}{[HP]} - 1\right] [P]$$

$$\frac{K_2}{[P]} = \frac{[H_t]}{[HP]} - 1$$

$$\frac{1}{[P]} = \left[\frac{1}{K_2} \times \frac{[H_t]}{[HP]}\right] - \frac{1}{K_2} \qquad (1)$$

Nous avons une équation de la forme :

$$y = a x - b$$

La droite représentative de cette fonction coupera :

- l'axe des abscisses pour $y = o$ d'où

$$\frac{[H_t]}{[HP]} = 1$$

- l'axe des ordonnées pour $x = o$ d'où :

$$\frac{1}{[P]} = -\frac{1}{K_2}$$

c'est-à-dire $[P] = K_2$

Expérience :

Nous réalisons une expérience analogue à celle de la détermination des dilutions limites.

C'est-à-dire qu'en présence d'une dose fixe d'histamine, 0,2 nM/ml dans le bain, nous plaçons au contact de l'iléon isolé de Cobaye des dilutions de protéine à partir de la DMA. Nous mesurons la diminution d'activité biologique provoquée par chacune de ces dilutions.

Nous utilisons comme échantillon de protéine, la même préparation considérée comme pure que lors de la détermination de la constante de dissociation histamine-protéine dans le cadre du phénomène physico-chimique (Partie IV, Chap. 2, III).

Nous prenons pour P la quantité de protéine introduite dans le bain.

Résultats :

Les résultats sont reportés Tableau XX - Fig. 19.

La droite représentative de la fonction étudiée correspondant à l'équation (1), est représentée Fig. 19.

Les concentrations exprimées en ng/ml lors des résultats pharmacologiques, sont transformées en M/l pour le tracé. Nous prenons comme poids moléculaire 110 000 tel que déterminé en gel de poly-acrylamide de concentration croissante (Partie III, Chap. 6, I D).

Nous en déduisons que K_2, ou constante de dissociation dans le cadre du phénomène pharmacologique est en M/l

$$K_2 = 0,26 \times 10^{-13}$$

à deux constantes près (réaction entre histamine - protéine molécule à molécule - et quantité de protéine totale assimilée à P).

Discussion :

Cette constante de dissociation K_2 nous montre une affinité de 4×10^{13} M, beaucoup plus élevée que dans le cadre du phénomène physico-chimique ($K_1 = 1,85 \times 10^{-6}$, affinité $= 0,84 \times 10^{6}$).

A quoi est due cette discordance ?

Essentiellement au fait que phénomènes pharmacologique et physico-chimique ne sont pas assimilables.

En fait, nous étudions un phénomène complexe qui est la somme d'au moins trois réactions :

Définissons les termes :

$[P_I]$ Concentration en protéine susceptible de réagir avec l'iléon.

$[I_P]$ Nombre de sites de l'iléon susceptibles de réagir avec la protéine.

$[P_I I_P]$ Quantification de la combinaison protéine-iléon.

$[H_P]$ Concentration en histamine susceptible de réagir avec la protéine, c'est-à-dire intervenant aussi dans le phénomène physico-chimique.

$[P_H]$ Concentration en protéine susceptible de réagir avec l'histamine, comparable au phénomène physico-chimique.

$[H_P P_H]$ Quantification de la combinaison protéine-histamine.

$[H_I]$ Concentration en histamine pouvant réagir avec l'iléon.

$[I_H]$ Nombre de sites de l'iléon susceptibles de réagir avec l'histamine.

$[H_I I_H]$ Quantification de la combinaison histamine-iléon.

Le seul paramètre mesurable est l'activité résiduelle de l'histamine, c'est-à-dire $[H_I]$.

Le seul paramètre connu est la quantité de protéine totale, c'est-à-dire la protéine introduite dans le bain.

Il est un paramètre constant, la surface de l'iléon.

Les autres paramètres restent inaccessibles à nos méthodes actuelles.

Nous pouvons écrire :

(1) $[P_I] + [I_P] \rightleftharpoons [P_I I_P]$

(2) $[P_H] + [H_P] \rightleftharpoons [P_H H_P]$

(3) $[I_H] + [H_I] \rightleftharpoons [I_H H_I]$

Nous savons que les réactions sont réversibles, mais nous ne savons pas encore dans quelle mesure ces réactions sont équilibrées.

Nous ne savons pas si le phénomène ou l'un des phénomènes obéit à une loi du "Tout ou Rien" ou à une autre loi. Quand nous disons par exemple :

- la protéine diminue de 20 p. cent l'activité biologique de l'histamine, nous ne savons pas :

TABLEAU XX

Détermination de la dose minimale active d'un échantillon protéique pur - Données numériques pour déterminer la constante de dissociation dans le cadre du phénomène pharmacologique.

Protéine ng/ml	Pourcentage d'histamine dissimulée	P M/l	HP M/l	1/ P	$\frac{H_t}{HP}$
0,20	20	18×10^{-13}	40×10^{-9}	$0,055 \times 10^{-13}$	5
0,10	15-20	$9,9 \times 10^{-13}$	35×10^{-9}	$0,11 \times 10^{-13}$	5,70
0,05	15	$4,5 \times 10^{-13}$	30×10^{-9}	$0,22 \times 10^{-13}$	6,60
0,02	10	$1,8 \times 10^{-13}$	20×10^{-9}	$0,55 \times 10^{-13}$	10
0,01	0-5	$0,99 \times 10^{-13}$	10×10^{-9}	$1,1 \times 10^{-13}$	20

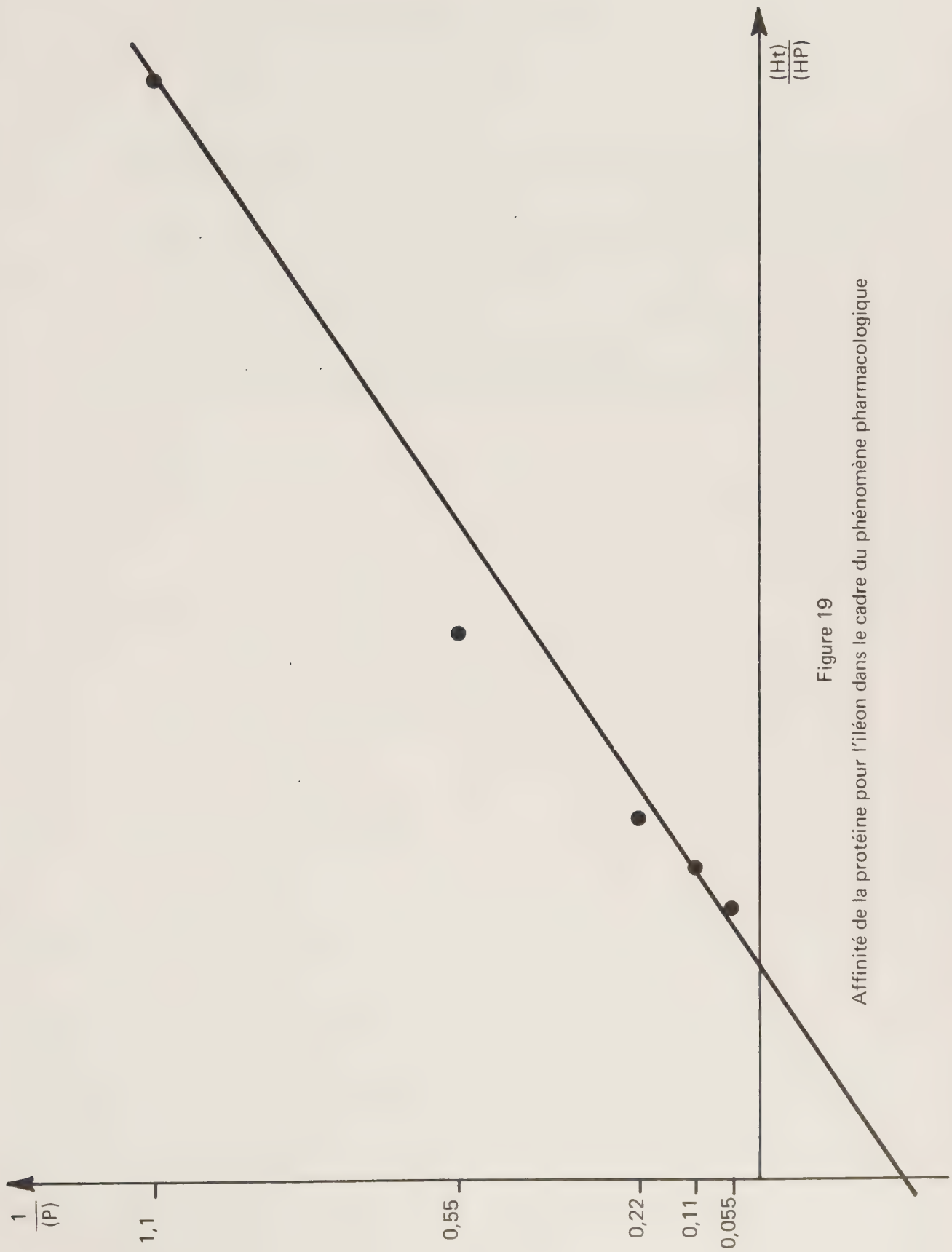


Figure 19

Affinité de la protéine pour l'iléon dans le cadre du phénomène pharmacologique

. si 20 p. cent de l'histamine n'a plus d'activité contracturante et 80 p. cent une activité normale,

. ou si 100 p. cent de l'histamine a une activité contracturante diminuée à 80 p. cent de la normale.

Nous ne savons pas encore si les sites sur l'iléon sont les mêmes pour protéine et histamine, ou si les sites sur la protéine sont les mêmes pour l'iléon et histamine, et dans quelle mesure ces sites interfèrent les uns avec les autres.

De plus, nous provoquons une réaction électrophysiologique dont certains paramètres nous sont inconnus, a fortiori les lois régissant leur activité.

A ce stade, nous pouvons prendre deux orientations :

- Effectuer des hydrolyses ménagées et voir leur répercussion sur chacun des phénomènes physico-chimique et pharmacologique,

- Mettre au point, pour les paramètres inconnus jusqu'ici, des méthodes de mesure.

CHAPITRE III

INFLUENCE DES HYDROLYSES

Le principe de ces hydrolyses repose sur les propriétés qu'ont des enzymes donnés, ou des réactifs donnés et en conditions expérimentales précises, de réaliser des coupures déterminées dans la structure primaire de la glycoprotéine. Ceci conduit à des sous-unités de poids moléculaire inférieur à celui de la molécule initiale.

La technique générale utilisée consiste à incuber une fraction enrichie en principe actif, avec le réactif choisi, pendant 24 heures à 37°. La fraction enrichie, d'activité connue (x = 1 ng), provient d'un sérum huamin normal soumis à une diafiltration sur membrane XM 300.

Le produit d'incubation, sauf remarque particulière, est divisé en deux parties :

- une partie est soumise à l'essai pharmacologique,
- l'autre partie est soumise à une chromatographie sur gel de Séphadex G 100.

Nous allons voir successivement et pour chacune de ces hydrolyses, le principe d'action du réactif utilisé, le résultat obtenu et la discussion de ce résultat.

I - PROTEOLYSE PAR LA TRYPSINE.

A - Principe :

La trypsine est une endopeptidase. Son activité est très spécifique : elle hydrolyse les liaisons admides esters ou peptides impliquant le carboxyle de la L-arginine ou de la L-lysine.

B - Technique :

Nous réalisons une incubation de 50 mg de la fraction enrichie en principe actif avec une solution de trypsine CHOAY renfermant $0,5 \times 10^{-5}$ unités, dans 2 ml de tampon phosphate 0,15 M.

C - Résultat :

- Après hydrolyse trypsique, l'activité pharmacologique devient nulle.
- La chromatographie montre (Fig. 20) :
  . deux pics importants dont les Ve/Vo sont respectivement 1 (volume mort de la colonne) et 2,8 (volume d'élution des petites molécules)
  . un pic de moindre surface dont le Ve/Vo est 2,1.

Les deux dernières fractions éluées (Ve/Vo = 2,1 et 2,8) attaquent une plaque de gélatine, montrant qu'elles correspondent à la présence de trypsine.

D - Discussion :

Malgré un excès d'enzyme par rapport au substrat, l'attaque trypsique n'a libéré qu'un nombre restreint de petites molécules, et l'on trouve encore une quantité importante de protéines au niveau du volume d'exclusion de la colonne, c'est-à-dire au niveau du volume d'élution de la glycoprotéine étudiée.

Nous savons en effet que la trypsine n'a qu'une action modérée sur les glycoprotéines dont la copule glucidique semble avoir une action protectrice sur la copule protidique.

Cependant, nous notons que l'ensemble de la fraction résultant de l'hydrolyse trypsique a perdu toute activité pharmacologique.

L'action de la trypsine, malgré ses limites, a donc dû :

- soit se porter sur le site actif,
- soit modifier de telle manière la structure tertiaire de la protéine que la molécule est devenue inactive.

II - PROTEOLYSE PAR LA PRONASE

A - Principe :

La pronase fut obtenue à partir de "Streptomyces griseus" par NOMOTO et NARAHASHI (65).

Elle a une activité très peu spécifique. En effet, elle agit sur les substrats protéiques en provoquant une dégradation pouvant aller jusqu'au stade petits peptides et même aminoacide. Très peu de liaisons restant intouchées, dans le cas de glycoprotéines, la dégradation peut aller jusqu'au stade hétéroside d'un amino-acide ou d'un diso-peptide lié à l'extrémité réductrice terminale d'un digosaccharide.

B - Technique :

Nous opérons en tampon phosphate 0,01 M de pH 7,3 additionné de quelques gouttes d'acétate de calcium M.

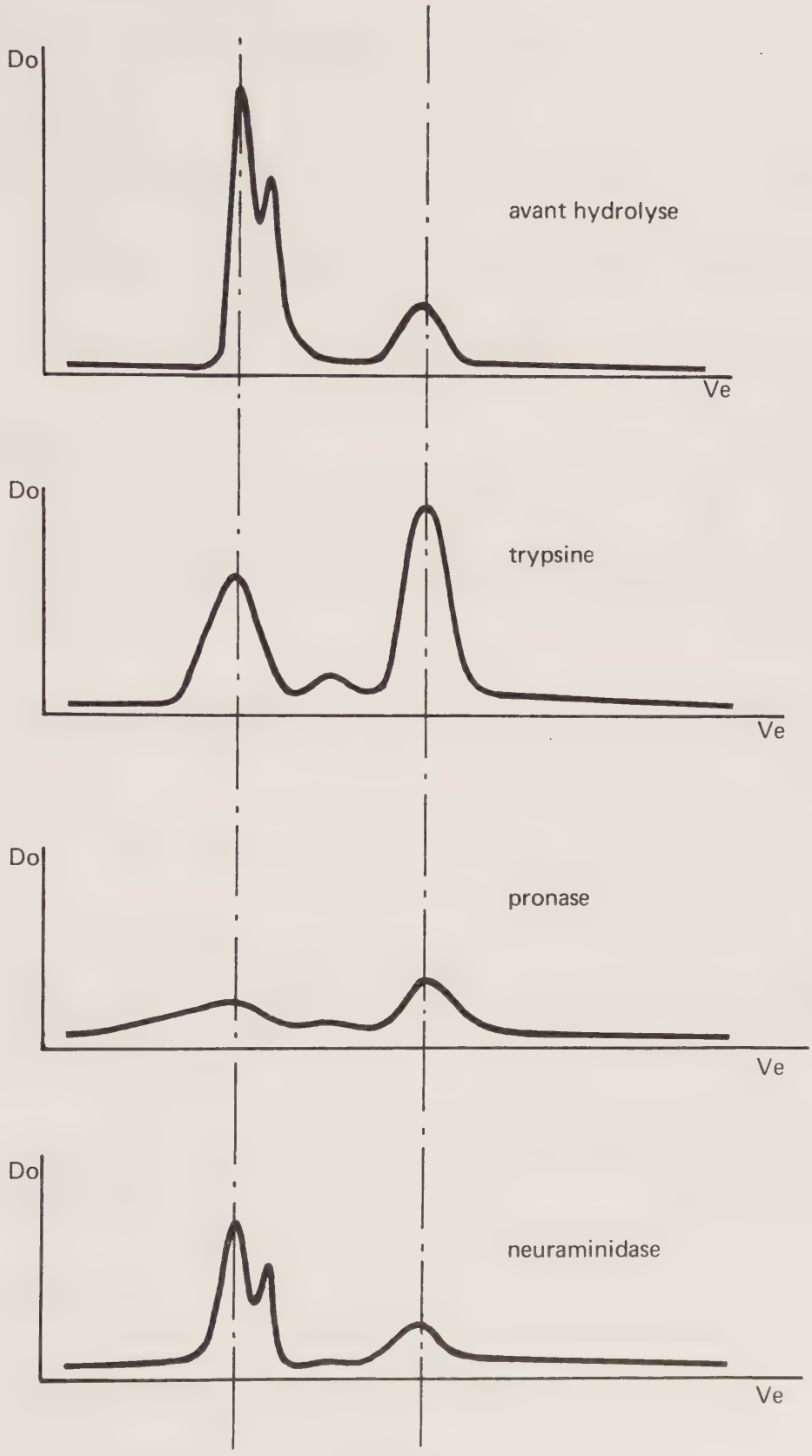


Figure 20

Courbes comparatives des chromathographies de filtration sur gel de Séphadex G 100 des hydrolysats

L'hydrolyse est réalisée en respectant un rapport enzyme-substrat de 1/40.

C - Résultats :

- Après hydrolyse par la pronase, il ne subsiste plus aucune action pharmacologique.
- Par chromatographie de l'hydrolysat (Fig. 20), nous notons la présence d'un faible clocher au niveau du volume mort de la colonne, et deux clochers au niveau du volume d'élution de molécules de moindre taille.
- Seule, la fraction exclue attaque la gélatine. C'est dans cette fraction que se trouve la pronase.

D - Discussion :

L'attaque de la pronase est brutale, sans spécificité.

Cette expérience prouve que l'activité de la glycoprotéine étudiée n'est pas portée par une petite fraction de la molécule mais plus probablement par une partie macromoléculaire.

III - HYDROLYSE PAR LA NEURAMINIDASE

A - Principe

La neuraminidase est extraite de Clostridium perfringens ou de Vibrio cholerae.

Selon GOTTSCHALK, elle se définit comme pouvant hydrolyser les liaisons glycosidiques entre le groupement cétonique de l'acide neuraminique et le D galactose ou la D Galactosamine ou éventuellement d'autres monosaccharides et dérivés (GOTTSCHALK, 30). Mais l'acide neuraminique substitué peut ne pas être libéré (GOTTSCHALK, 29), en particulier en raison d'empêchements stériques.

Jusqu'à présent, on n'a trouvé que le galactose et la N acétylgalactosamine comme sucre relié à l'acide sialique par cette liaison cétosidique. Et parmi les glycoprotéines à haut poids moléculaire seulement 60 à 80 p. cent des résidus d'acide sialique sont détachés par l'enzyme (GOTTSCHALK, 31).

B - Expérience :

Nous faisons incuber 2 mg de neuraminidase SIGMA produite par Clostridium perfringens, d'activité 0,08 U/neuraminyl-lactose par mg, avec 50 mg d'une fraction enrichie en principe actif, dans 2 ml de tampon phosphate 0,15 M - pH 7,2.

C - Résultats :

- Après action de la neuraminidase, la chromatographie sur gel de Séphadex G 100 ne nous montre pas de modification significative du profil de la chromatographie (Fig. 20).
- Par contre, nous constatons une perte totale de l'activité sur le plan pharmacologique.

D - Discussion :

- Il n'est pas étonnant de voir le même tracé de chromatographie avant et après action enzymatique, car la neuraminidase a une action sélective : elle coupe les liaisons avec l'acide sialique terminal. Il n'est donc pas surprenant que la modification du poids moléculaire ne soit pas perceptible par les méthodes employées.
- L'acide sialique terminal semble nécessaire à l'activité pharmacologique, sans que l'on puisse préciser de quelle manière il est impliqué dans le phénomène. Il est connu que les liaisons sialyles terminales conditionnent la viscosité des glycoprotéines par la polarité de l'acide sialique. Peut-on invoquer ici la même explication ?

IV - ATTAQUE ALCALINE

A - Principe

Cette technique fut appliquée par GOTTSCHALK et PIGMAN aux mucines sous-maxillaires ovines et bovines.

Elle repose sur la labilité des liaisons O-séryl et O-thréonyl glycosidiques en milieu alcalinisé par de la soude en faible concentration.

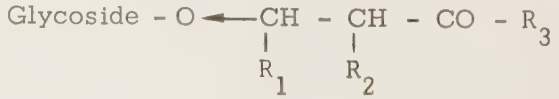
Elle ne peut s'appliquer qu'aux liaisons glycosides avec OH en β d'un carbonyle.

Selon MONTREUIL (61), il se produit une libération : (Fig. 21)

- d'une part de glycannes. Si l'on opère en milieu réducteur (borohydrure alcalin 0,3 M), il y a réduction de la fonction semi-acétalique de l'ose engagé en polyol ; les fonctions aldéhydiques libres étant réduites les sucres sont protégés d'une dégradation par récurrence ;
- d'autre part des restes β hydroxyaminoacyles qui sont transformés en restes déhydroaminoacyles : le reste séryle devient 2 amino-2 propénoyle, le reste thréonine 2 amino-3 buténoyle ; l'un et l'autre restant conjugués au sein de la chaîne peptidique.

Voyons le mécanisme de la réaction, selon MONTREUIL et AL. (60)

Si l'on schématise la liaison O-glycosidique :



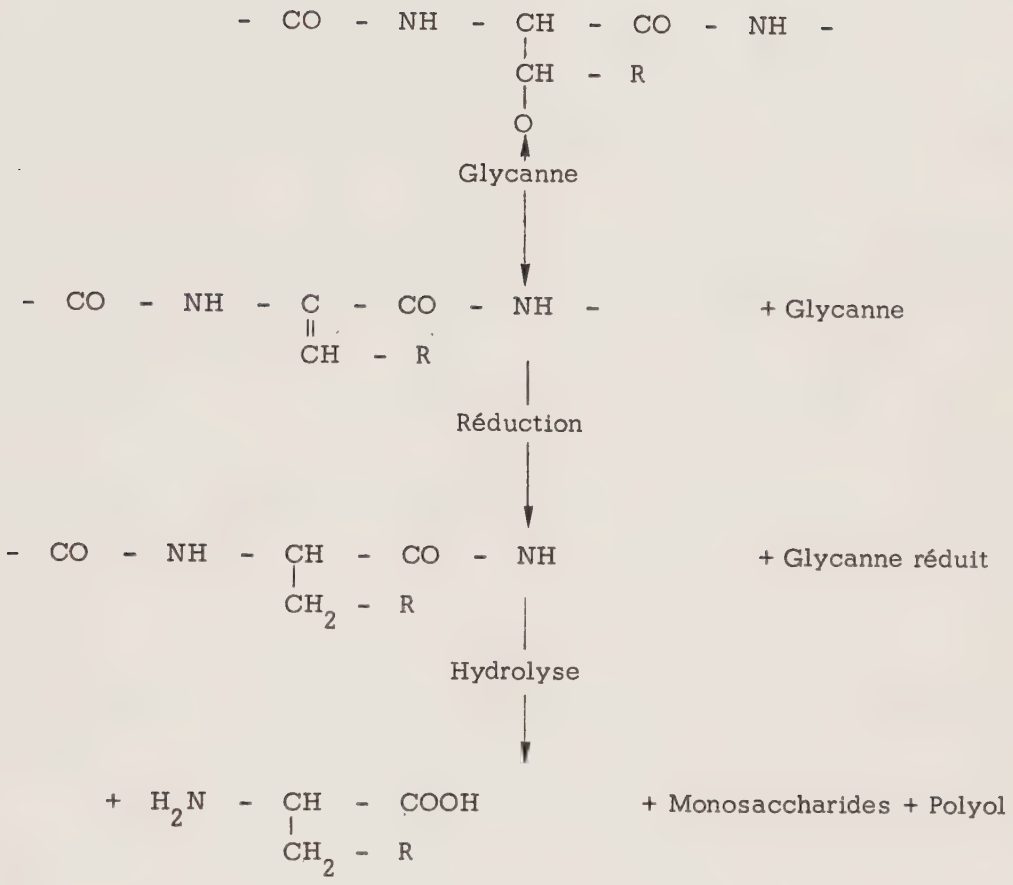
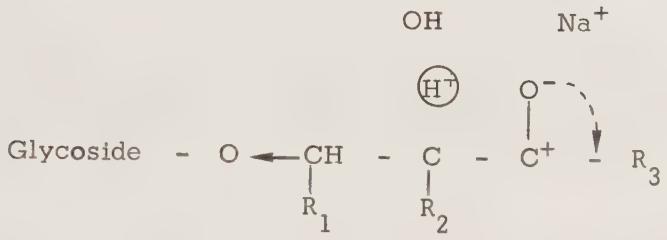


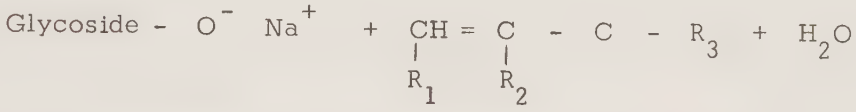
Fig. 21

Etude de la β Elimination selon MONTREUIL (61)

- une polarisation de la liaison O-glycosidique donne au carbone β une charge positive permanente ;
- le carbonyle s'énolise en milieu alcalin,
- il y a ainsi fragilisation de la liaison carbonyle, un proton se détache et il se forme alors un carbanion.



- un électron est transféré de la fonction énol et du doublet libre du carbone ∝ vers le carbone β.



Ceci refoule le doublet de la liaison polaire formé au premier stade, la liaison O-Glycosidique se rompt.

B - Expérience :

20 mg de la fraction enrichie sont incubés avec 3 ml de NaOH 0,5 N pendant 24 h à 37°.

L'ensemble est ensuite neutralisé à pH 7, puis soumis au dosage pharmacologique.

C - Résultats :

Nous constatons qu'il y a perte de toute activité pharmacologique.

D - Discussion :

La perte de toute activité en ce cas nous montre que l'attaque alcaline détruit une partie de la protéine intervenant dans le phénomène pharmacologique :

- soit comme élément du site actif,
- soit dans le maintien de la structure tertiaire.

V - COMPARAISON DE L'ACTION DE LA NEURAMINIDASE SUR LES PHENOMENES PHARMACOLOGIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE.

Nous venons de voir que l'action de la neuraminidase fait perdre toute activité pharmacologique. C'est-à-dire soit empêche la protéine de se fixer sur l'iléon, soit empêche la protéine de dissimuler l'histamine à l'action contracturante de l'iléon isolé de Cobaye.

Nous faisons appel à ce que nous avons dénommé jusqu'ici le phénomène physico-chimique pour voir si la protéine perd après action de la neuraminidase, sa capacité de fixer l'histamine.

A - Expérience :

- 15 mg d'une fraction de protéine considérée comme pure sont incubés avec 1 mg de neuraminidase SIGMA (0,08 U/mg neuraminyl-lactose, 0,012 U/mg mucine sous-maxillaire bovine) dans 3 ml de tampon phosphate 0,15 M de pH 7,2.
- La préparation est soumise à une chromatographie sur Séphadex G 100 équilibré en eau distillée. Les fractions correspondant au pic exclu sont rassemblées et concentrées.
- L'échantillon obtenu est soumis à une incubation avec 300 nM d'histamine ^{14}C.
- L'ensemble est appliqué sur une colonne de chromatographie de Biogel P 10 équilibrée en eau distillée.
- La fraction exclue est lyophilisée, puis étudiée
  + sur le plan pharmacologique : nous déterminons la nouvelle valeur de l'unité, et la quantité d'histamine libre présente,
  + par dosage de la radioactivité : nous déterminons l'histamine totale présente par mg de fraction.
- Un témoin de la même fraction protéique est incubé de la même manière avec de l'histamine et étudié de la même façon sur le plan pharmacologique et par radioactivité β émise.

B - Résultats :

Les résultats sont reportés Tableau XXI.

C - Discussion :

L'action de la neuraminidase, qui détache les acides sialiques terminaux de la protéine, fait perdre à celle-ci ses propriétés pharmacologiques.

Par contre, la protéine continue à capter l'histamine, et ceci dans des quantités à peine moindres que celles du témoin.

Nous nous demandons alors si cette captation n'est pas due à la neuraminidase, présente dans la fraction soumise à l'incubation avec l'histamine. Nous faisons un témoin en faisant incuber dans les mêmes conditions neuraminidases et histamine seules ;

TABLEAU XXI

Etude comparative d'une fraction soumise à l'action de la neuraminidase (F 970) et d'une fraction témoin (F 969)

	F 969	F 970
xo (ng)	0,1	0,1
		Action de la neurami-raminidase
	Incubation avec Histamine	Incubation avec Histamine
X1 (ng)	0,9	90×10^3
H libre (nM/mg)	0,02	0,02
H totale (nM/mg)	0,34	0,26

TABLEAU XXII

Etude comparative d'une fraction soumise à l'attaque alcaline (F 972) et d'une fraction témoin (F 971)

	F 971	F 972
x_o (ng)	0,1	0,1
		élimination
	Incubation avec Histamine	Incubation avec Histamine
x_1 (ng)	0,9	90×10^3
H libre (nM/mg)	0,01	0,01
H total (nM/mg)	0,34	0,22

après chromatographie de cette préparation sur Biogel P 10 équilibré en eau distillée, la fraction exclue ne montre aucune capacité de fixer l'histamine.

Nous en concluons donc que fixation de la protéine sur l'iléon dans le cadre du phénomène pharmacologique et captation de l'histamine dans le cadre du phénomène physico-chimique ne procèdent pas du même mécanisme. Dans le premier cas, l'acide sialique terminal de la protéine est nécessaire. Dans le second cas, son élimination ne semble pas altérer les propriétés de la protéine vis-à-vis de l'histamine.

VI - COMPARAISON DE L'EFFET DE L'ATTAQUE ALCALINE SUR LES PHENOMENES PHARMACOLOGIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE .

Nous venons de voir que l'attaque alcaline enlève toute activité pharmacologique. Que se passe-t-il au niveau du phénomène physico-chimique ?

A - Expérience :

- 50 mg d'une fraction de protéine considérée comme pure sont incubés avec 3 ml de NaOH 0,1 N, pendant 16 heures à 37°.
  (Nous utilisons de la soude 0,1 N au lieu de soude 0,5 N comme dans l'expérience même chapitre, II, B, pour limiter au maximum les destructions sur la molécule).
- L'ensemble est neutralisé à pH 7,0 avant d'être incubé avec 300 µM d'histamine ^{14}C.
- Puis la préparation est appliquée sur une colonne de chromatographie de Biogel P 10 équilibré en eau distillée.
- La fraction exclue est lyophilisée, puis soumise :
  = à un essai pharmacologique, pour déterminer :
  + la nouvelle valeur de l'unité x_1,
  + la quantité d'histamine libre présente,
  = au dosage de la radioactivité, pour connaître l'histamine totale présente par fraction.

Nous comparons avec le témoin traité dans les mêmes conditions d'incubation et de chromatographie sur gel.

B - Résultats :

Les résultats sont reportés dans le Tableau XXII.

C - Discussion :

Nous confirmons que l'attaque alcaline fait perdre à la protéine toute propriété de fixation sur l'iléon et de diminution d'activité biologique de l'histamine.

Par contre, nous remarquons, aux erreurs de manipulation près la conservation du pouvoir de captation de l'histamine dans le cadre du phénomène physico-chimique.

Comme dans le cas de l'action de la neuraminidase, nous en concluons que les deux phénomènes pharmacologique et physico-chimique, ne procèdent pas du même mécanisme. Dans le premier cas, (dans la mesure où l'attaque alcaline a respecté la copule peptidique), l'intégrité des liaisons O-séryl et O-thréonyl glycanne est nécessaire. Dans le second cas, leur suppression ne semble pas empêcher la protéine de capter l'histamine.

VII - CONCLUSIONS PRINCIPALES DE CE CHAPITRE

L'attaque par la trypsine et par la pronase enlève toute activité pharmacologique à la protéine.

Dans le cas de la neuraminidase et de l'attaque alcaline, les conclusions sont plus nuancées et permettent de différencier phénomène physico-chimique et phénomène pharmacologique.

Dans ce dernier cas, l'intégrité des liaisons avec l'acide sialique, ou des liaisons O-séryl et O-thréonyl glycosidique est nécessaire. Alors que la rupture de ces mêmes liaisons permet la formation de la combinaison histamine-protéine dans le cadre du phénomène physico-chimique.

CINQUIEME PARTIE
DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

- PREPARATION DE LA PROTEINE - CRITERES DE PURETE - COMPOSANTS.

La protéine a été isolée à l'état presque pur.

Ceci nous a permis de confirmer les données déjà connues.

Nous en mettons en évidence la propriété de glycoprotéine.

Nous appliquons à la copule protidique deux sortes de dosage (méthode de Lowry et méthode de Biuret) pour la quantifier. Nous préférons nous rapporter à la méthode du Biuret pour les résultats étant donné les erreurs introduites par la copule glycanne, (or, ici, elle est importante) dans le dosage par la méthode de Lowry. Ceci nous donne respectivement :

- pour la protéine d'origine humaine : 56 p. cent,
- pour la protéine d'origine porcine : 42,8 p. cent.

Comme c'est toujours le cas, nous ne pouvons exprimer nos déterminations que par rapport à un étalon de sérum-albumine. Les résultats ne peuvent donc pas exprimer de façon absolument exacte la copule protidique.

En ce qui concerne la copule glucidique, nous effectuons les dosages des divers constituants de la protéine d'origine humaine :

- Acides sialiques (méthode de Warren) : nous trouvons un chiffre élevé 15 p. cent. Ceci constitue un pourcentage considérable, supérieur à celui de la glycoprotéine sérique la plus riche actuellement connue : l'orosomucoïde (12,1 p. cent) (*)

- Hexoses totaux, par la méthode à l'orcinol (étalon Gal-Man : 2 - 1) : 16,9 p. cent.

Ce pourcentage ne correspond qu'à une proposition. En effet, nous faisons cette évaluation par rapport à un témoin arbitraire. Or, comme nous l'avons dit (Partie II, Chap. 9, II), les résultats doivent être rendus par rapport à un étalon dont la composition se rapproche le plus possible de celle de l'échantillon étudié. Cette composition n'a pas encore pu être faite, faute de matière première.

(*) Les chiffres avancés concernant les glycoprotéines de comparaison sont ceux donnés par SCHUTTZE et HEREMANS (88).

Si nous comparons le chiffre avancé à celui donné pour les glycoprotéines connues, nous voyons que là encore, la composition en hexoses est supérieure à celle des autres glycoprotéines sériques, et en particulier à celle de l'orosomucoïde (14,7 p. cent) (*).

- Fucose : Le chiffre de 1,3 p. cent montre que là encore, la protéine étudiée est plus riche qu'aucune glycoprotéine sérique humaine (orosomucoïde : 0,7 p. cent - transcortine : 0,8 p. cent - α_1 glycoprotéine : 0,7 p. cent) (*).

- Osamines : Nous trouvons 14,3 p. cent, chiffre voisin de celui de l'orosomucoïde (13,9 p. cent) (*).

Là encore, il faut apporter des restriction à la valeur de ce chiffre. En effet, le spectre d'absorption varie en fonction de la configuration chimique de l'osamine, et l'étalon devrait se rapprocher le plus possible par sa composition de la glycoprotéine à doser.

L'ensemble de ces pourcentages (103,5 p. cent) montre une certaine erreur par excès, en fait reflet de la somme des erreurs ci-dessus.

Ces déterminations demandent des dosages faits dans des conditions précises : étalons appropriés, temps d'hydrolyse progressif (quand celle-ci est nécessaire), expérience faite sur protéine non traitée, puis sur protéine débarrassée de la copule peptidique (en particulier par hydrolyse pronasique) pour éliminer au maximum son interférence.

Les résultats des dosages doivent être confrontés avec des chromatographies qualitatives et quantitatives. L'ensemble ne peut être ensuite interprétable que par comparaison de données statistiques. Les chiffres donnés ici ne peuvent donc être que des indications préliminaires.

La composition en acides aminés a été abordée. Mais nous devons apporter certaines restrictions :

- Le tryptophane est détruit au cours de cette hydrolyse,
- La présence d'une copule glycannique importante n'a fait que favoriser la destruction de certains acides aminés, en particulier de la cystéine et de la lysine ;
- Les acides aminés inconnus pourraient être identifiés aux osamines, dont le dosage a montré l'importance dans la molécule étudiée ; cependant, nous n'avons pu encore vérifier cette hypothèse.

Par rapport à l'orosomucoïde, glycoprotéine dont la composition se rapproche le plus, semble-t-il, de la protéine étudiée, nous avons une composition en acides aminés dicarboxyliques plus faible, ce qui peut expliquer le point isoélectrique plus élevé (4,0 ± 0,1), que celui de l'orosomucoïde (2,7).

(*) Les chiffres avancés concernant les glycoprotéines de comparaison sont ceux donnés par SCHULTZE et HEREMANS (88).

II - ACTION DE LA PROTEINE

Nous apportons des précisions au mode de fonctionnement du phénomène pharmacologique.

Nous savons que c'est un phénomène limité à 20 p. cent dans son effet, qu'il s'effectue sans dégradation de la protéine, que la fixation de cette dernière ne dure que le temps de la présence d'histamine dans le bain, et nous sommes sûrs qu'il n'y a pas interférence par action propre soit de l'iléon, soit de produits de lyse de ce dernier. Mais, il est à remarquer que toutes nos conclusions sont des déductions basées sur des activités pharmacologiques. Les preuves définitives devront être apportées par des expériences utilisant une protéine marquée mais non dénaturée.

Nous apportons la preuve de l'existence du phénomène physico-chimique. Il semble parallèle, dans ses manifestations, au phénomène pharmacologique quand on considère la protéine non traitée.

Cependant, s'il existe entre eux des facteurs communs, expliquant ce parallélisme, il y a d'autres facteurs permettant de les différencier :

- en particulier, nous mettons en évidence que les restes sialyles et l'intégrité des liaisons O-séryl et O-thréonyl glycannes, dans la mesure où la copule peptidique a été respectée par l'attaque alcaline pratiquée, sont nécessaires à l'existence du phénomène pharmacologique et non à celle du phénomène physico-chimique.

Une approche de quantification des deux affinités nous donne également des résultats très différents :

$= 0,84 \times 10^6$ pour le phénomène physico-chimique,

$= 4 \times 10^{13}$ pour le phénomène pharmacologique.

En fait, nous comparons des phénomènes différents :

- Dans le phénomène physico-chimique, les choses sont simples, le résultat est sans conteste, à un coefficient près (que protéine et histamine réagissent molécule à molécule).
- Dans le phénomène pharmacologique, nous avons en fait interaction entre trois phénomènes. L'un des éléments essentiels, l'iléon, est encore inaccessible à nos méthodes actuelles.

Nous nous heurtons d'ailleurs là au problème très général des récepteurs : les agonistes que l'on fait agir provoquent un changement dans la perméabilité de la membrane aux ions, ce qui se manifeste par un changement dans le potentiel électrique (GOLDSTEIN et Al., 28) objectivé dans notre cas particulier, par une contraction de l'iléon.

Chacun de ces composants obéit à ses propres lois, et ce que nous voyons n'est qu'un ensemble de phénomènes. Avons-nous le droit d'appliquer à cet ensemble la même loi d'action de masse qui régit une réaction équilibrée entre deux réactifs parfaitement dosables ?

L'établissement de la droite de HILL, expression de

$$\frac{\text{Effet}}{\text{Effet MAX} - \text{Effet}}$$ en fonction de $\frac{1}{(P)}$ (RANG, 73)

nous donne un profil qui nous montre que nous sommes effectivement devant un phénomène complexe.

De plus, le problème est compliqué du fait que le phénomène atteint un palier de saturation au-delà de la DMA, seuil à partir duquel, quelle que soit la quantité de protéine mise en présence de l'iléon, nous avons l'effet maximum.

Au-dessous de la DMA, toute la protéine introduite dans le milieu participe au phénomène et se fixe vraisemblablement sur l'iléon, puis nous ne retrouvons rien dans le bain d'expérience.

Nous n'avons donc jamais de protéine active libre en quantité dosable dans le milieu.

Nous ne pouvons en conséquence respecter la valeur des paramètres de la réaction équilibrée régie par la loi d'action de masse. Celle-ci, dans notre cas particulier, s'écrit :

(1) (Protéine) + (Iléon p) $\rightleftharpoons$ (Protéine - Iléon p)

(Iléon p = site de l'iléon pour la protéine).

Mais la réversibilité de cette réaction est contestable :

- Lorsque nous faisons des lavages avec des solutions d'histamine, nous diminuons la concentration de la protéine, celle-ci devrait se libérer de la combinaison qu'elle forme avec l'iléon, ce n'est pas le cas.
- Ce n'est que lorsque nous rinçons avec un liquide de Tyrode dépourvu d'histamine que nous voyons la combinaison protéine-iléon se dissocier. Nous pouvons admettre effectivement à ce moment que la réaction est réversible : la concentration en protéine diminue, l'équilibre se déplace vers la gauche. Mais, à partir de l'instant où il n'y a plus d'histamine dans le milieu, nous ne pouvons plus objectiver le phénomène pharmacologique.
- Tout se passe comme si la très forte affinité trouvée dans le cadre du phénomène pharmacologique ($0,26 \times 10^{-13}$ à deux constantes près) présidait à une réaction impliquant à la fois protéine iléon et aussi histamine - et la valeur trouvée laissant penser à une liaison extrêmement solide - Mais lorsque l'histamine est éliminée, un simple lavage suffit à rompre la liaison protéine - iléon (p) comme si l'affinité protéine-iléon diminuait alors.

Mais nous avons aussi :

(2) (Histamine) + (Iléon h) $\rightleftharpoons$ (Histamine - Iléon h)

(Iléon h = site de l'iléon pour l'histamine), correspondant semble-t-il à l'action physiologique de l'histamine et la DMA masque 20 p. cent de iléon h, semble-t-il.

C'est donc dire qu'il peut y avoir deux sortes de sites. Nous ne savons pas si tous les sites homogènes obéissent à la même loi et s'il n'y a pas, par exemple, un phénomène coopératif ; ici l'incertitude est doublée.

Enfin, nous pouvons dire qu'une troisième réaction vient s'ajouter aux précédentes :

(3) (Protéine) + (Histamine) $\rightleftharpoons$ (Protéine - Histamine)

Si nous nous fions à l'affinité trouvée dans le cadre du phénomène physico-chimique, l'affinité dans ce cas est de l'ordre de $0,84 \times 10^6$, donc beaucoup moindre que celle évoquée dans le cadre du phénomène pharmacologique.

Ceci est cohérent, quand on considère la comparaison entre phénomènes pharmacologiques et physico-chimiques expérimentalement (Partie IV, Chap. 2, II).

SIXIEME PARTIE

CONCLUSIONS GENERALES

Nous confirmons les caractéristiques déjà établies de la protéine :

- zone de relargage au sulfate d'ammonium pH 7, 2,4 - 3,2 M ;
- solubilité dans l'acide phytique 0,1 N.

La chromatographie sur carboxy-méthyl-cellulose confirme que le point isoélectrique est inférieur à 4,2 et correspond donc à la valeur précédemment trouvée : $4,0 \pm 0,1$.

Le gel de polyacrylamide en gradient de concentration en gel attribue à la protéine humaine un poids moléculaire de 110000, à la protéine d'origine porcine un poids moléculaire de 120000.

Nous avons surtout étudié la protéine d'origine humaine (F 947) :

- L'immuno-électrophorèse décèle la présence d'une impureté albuminique que la méthode de Laurell quantifie à 1,1 p. mille.
- Par la méthode de Biuret, nous quantifions la copule protidique : 56 p. cent.
- Nous avons fait une approche de la copule glycannique :
  - = elle est importante en pourcentage : 47,5 p. cent ;
  - = quand on la compare aux autres glycoprotéines et en particulier à l'orosomucoïde, elle se caractérise par sa richesse en acides sialiques et en fucose ;
  - = la présence de liaisons O-séryl et O-thréonyl glycanne semble démontrée par l'influence de la β élimination sur les propriétés de la protéine dans la mesure où une altération de la copule peptidique n'a pas joué un rôle dans les variations d'activité constatées.

La protéine d'origine porcine (F 950) présente une copule protidique inférieure par la même méthode du Biuret : 42 p. cent.

Pour les deux échantillons étudiés (F 947, F 950), nous avons effectué une première détermination de carbone - hydrogène-azote, ainsi qu'une analyse chromatographique sur échangeurs d'ions des acides aminés constitutifs.

Nous réalisons ainsi une progression dans l'apport de la connaissance biochimique de la molécule étudiée.

Dans le cadre du phénomène physico-chimique :

- Nous proposons une méthode permettant de la quantifier :

  - Sur la protéine native, nous trouvons une activité physico-chimique parallèle à l'activité pharmacologique quand on considère des échantillons à diverses valeurs de DMA.
  - La combinaison histamine-protéine obtenue par incubation présente une activité pharmacologique résiduelle, mais la valeur de la DMA est nettement augmentée. La diafiltration permet de libérer l'histamine liée de façon labile et de retrouver la valeur de la DMA de la protéine non traitée.

L'hydrolyse chlorhydrique libère la totalité de l'histamine fixée sur la protéine.

- L'affinité, à un coefficient près, est pour l'échantillon étudié $0,84 \times 10^{6}$, la constante de dissociation est $1,85 \times 10^{-6}$ à une constante près.
- A la différence du phénomène pharmacologique :
  - = l'acide sialique terminal n'est pas nécessaire à la formation de la combinaison histamine-protéine,
  - = après attaque alcaline, la macromolécule résiduelle conserve son pouvoir de formation de la combinaison histamine-protéine.

Dans le cadre du phénomène pharmacologique :

- Nous constatons que protéine d'origine humaine (F 947) et protéine d'origine porcine (F 950) ont même valeur de DMA : 0,1 ng.
- Nous précisons quelques éléments du phénomène :
  - = la protéine se fixe sur l'iléon en présence ou en l'absence d'histamine, mais n'est relachée qu'en absence d'histamine ;
  - = une seule DMA se fixe sur l'iléon quelle que soit la quantité de protéine introduite ;
  - = la protéine se fixe sans être en rien altérée, (libérée de l'iléon, puis remise en expérience, elle présente la même activité biologique) ;
  - = chez le sujet allergique, la protéine est, soit absente, soit non fonctionnelle ;
  - = l'histamine est nécessaire pour objectiver le phénomène pharmacologique dans le cadre de nos essais actuels ;
  - = les restes acide sialique sont nécessaires au phénomène pharmacologique ;
  - = l'attaque alcaline supprime le seul phénomène pharmacologique.
- Nous faisons une apporche de quantifi ation de l'affinité protéine-iléon mais avec des réserves dues à la complexité du phéonomène étudié et nous ne pouvons avancer un chiffre qu'à deux constantes près.

L'affinité trouvée est de $= 4 \times 10^{13}$.

Ce chiffre très élevé est en accord avec la valeur extrêmement faible de la dose minimale active : 0,1 ng.

La comparaison avec l'affinité présidant à la formation de la combinaison histamine-protéine montre que ce phénomène n'est pas en jeu dans la réaction au niveau de l'iléon.

Nous différencions ainsi deux phénomènes parallèles dans leur manifestation, mais différents dans leur modalité.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ABEL J.J. et KUBOTA S. -
J. Pharmacol. Exper. Ther. (1919), 13, 243.

2 - ACKERMANN D. -
Naturwissenschaften (1939), 27, 515.

3 - AGNERAY J. -
Thèse Doct. Sci. Lille, 1965.

4 - AGNERAY J., COURTOIS J.E., DURAND G., FEGER J., LEBEL B. et PARROT J.L. -
C. R. Acad. Sc. Paris S.D. (1968), 267, 260.

5 - ALBERT A. et SERJEANT E.P. -
Ionization constants of acids and bases.
London Methnen (1962).

6 - ALLAIN P. -
Thérapie (1969), XXIV, 757.

7 - ASH A.S.F., SCHILD H.O. -
Brit. J. Pharmacol. (1966), 27, 427.

8 - BENDITT E.P. -
Ann. N.Y. Acad. Sc. (1956), 73, 204.

9 - BLATT W.F., ROBINSON S.M. et BIXLER H.J. -
Anal. Biochem. (1968), 26, 151

10 - BOWNESS J.M. -
Biochem. J. (1958), 70, 110.

11 - BRODIE B.B., BEAVEN M.A., ERJAVEC F. et JOHNSON H.L. -
In Mechanism of release of biogenic amines.
Ed. U.S. VON EULER, J. ROSELL et B. ÜVNAS. Pergamon Press (1966).

12 - BROWN R.D. et HEFFERMAN M.L. -
Austral. J. Chem. (1959), 12, 543.

13 - CARLINI E.A. et GRENN J.P. -
Brit. J. Pharmacol. (1963), 20, 264.

14 - CLARKE M.H.G. et FREEMAN T. -
Clin. Sci. (1968), 35, 403.

15 - COHEN Y. -
J. Physiol. Paris (1953), 45, 86.

16 - COMBS J., CALDWELL L. et BOCKUS D. -
In Mechanism of release of biogenic amines.
Ed. U.S. VON EULER, J. ROSELL, B. ÜVNAS. Pergamon Press (1966).

17 - DALE H. et LAIDLAW P.P. -
J. Physiol. (Lond.), (1910), 41, 318.

18 - DANIELLI J.F., MORAN J.F. et TRIGGLE D.J. -
Fundamental concepts in drug receptor interaction.
Academic Press (1970), 261 p.

19 - DAY M. et GREEN J.P. -
J. Physiol. (Lond.), (1962), 164, 210.

20 - DISCHE Z. -
Biochem. Z. (1927), 189, 77.

21 - DISCHE Z. et SHETTLES L.B. -
J. Biol. Chem. (1948), 175, 595.

22 - DURAND G. -
Thèse Doct. Etat Pharm. Paris (1970).

23 - DURAND G., FEGER J., LEBEL B., AGNERAY J., COURTOIS J.E. et PARROT J.L. -
C.R. Acad. Sc. Paris, Série D (1971), 272, 2262.

24 - DURAND G., FEGER J., LEBEL B., AGNERAY J., COURTOIS J.E. et PARROT J.L. -
Biochimie, 53, n° 8, (1971), 909.

25 - ELSON L.A. et MORGAN W.T.J. -
Biochem. J. (1963), 27, 1824.

26 - FURANO A.V. et GREEN J.P. -
Biochim. Biophys. Acta (1964), 86, 596.

27 - GALLO G., PASQUALUCCI C.R., RADAELLI P. et LANCINI G. -
J. Org. Chem. (1964), 29, 862.

28 - GOLDSTEIN A., ARONOW L. et KALMAN S.M. -
In Principles of Drug Action, 884 p.
Ed. HARPER-ROW - New-York Evanston - London.

29 - GOTTSCHALK A. -
Biochim. Biophys. Acta (1956), 20, 560.

30 - GOTTSCHALK A. -
Biochim. Biophys. Acta (1957), 23, 645.

31 - GOTTSCHALK A. -
In The Enzymes 4, ed. BOYER P.D., LARDY H. et MYRBÄCK K.
Academic Press New-York (1960), 461 p.

32 - GRABAR P. et WILLIAMS C.A. -
Biochim. Biophys. Acta (1953), 10, 193.

33 - GRAHAM H.T., WHEELWRIGHT F., PARISH H.H. Jr., MARKS A.R. et LOWRY O.H. -
Fed. Proc. (1952), 11, 350.

34 - GRAHAM H.T., LOWRY O.H., WAHL N. et PRIEBAT M.K. -
J. Exp. Med. (1955), 102, 307.

35 - GREEN J.P. -
Advances in Pharmacol. (1962), 1, 349.

36 - GREEN J.P., DAY M. et ROBINSON J.D. -
Biochem. Pharmacol. (1962), 11, 957.

37 - GREEN J.P. et DAY M. -
Ann. N.Y. Acad. Sc. (1963), 103, 334.

38 - GREEN J.P. -
In Mechanism of release of biogenic amines
Ed. U.S. VON EULER, S. ROSELL et B. ÜVNAS, Pergamon Press (1966).

39 - HEIDELBERGER M. et KENDALL F.E. -
J. Exp. Med. (1932), 55, 555.

40 - JACOBSON Al. -
Biopolymers (1963), 1, 269.

41 - KAHLSON G. et ROSENGREEN E. -
Ann. Rev. Pharmacol. (1965), 5, 305.

42 - KERP L. -
Int. Arch. Allergy (1963), 22, 112.

43 - KIER L.B. -
J. Med. Chem. (1968), 11, 441.

44 - KRØLL J. -
Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1968), 22, 79.

45 - KRØLL J. -
Scand. J. Clin. Lab. Invest. (1969), 24, 55.

46 - LABAT J., LEBEL B., PARROT J.L. et COURTOIS J.E. -
C. R. Acad. Sc. Paris Série D (1966), 263, 2050.

47 - LABORDE C., PARROT J.L. et URQUIA D.A. -
Presse Médicale (1953), 61, 1151.

48 - LAGUNNOFF D. -
In Mechanism of release of biogenic amines
Ed. U.S. VON EULER, S. ROSELL, B. ÜVNAS, Pergamon Press (1966).

49 - LASKOWSKI M. et SCHERAGA H.A. -
J. Amer. Chem. Soc. (1954), 76, 6305.

50 - LAURELL C.B. -
Anal. Biochem (1965), 10, 358.

50 bis - LAURELL C.B. -
Anal. Biochem. (1966), 15, 45.

51 - LAVIRON E. -
Bull. Soc. Chim. Fr. (1963), 2840.

52 - LEBEL B. -
Thèse Doct. Pharm. (1971), Paris.

53 - LEVY M. -
J. Biol. Chem. (1935), 109, 361.

54 - LI N.C., DOODY E. et WHITE J.M. -
J. Amer. Chem. Soc. (1957), 79, 5859.

55 - MANCINI G., CARBONARA A.O. et HEREMANS J.F. -
Immunochemistry (1965), 2, 235.

56 - MARGOLIS J. et KENRICK K.G. -
Anal. Biochem. (1968), 25, 347.

57 - MICHAELSON I. et WHITTAKER V.B. -
Biochem. J. (1962), 84, 31.

58 - MIESCH F., BIETH J. et METAIS P. -
Annal. Biol. Chem. (1968), 26, 939.

59 - MONTREUIL J. et SPIK G. -
Microdosage des glucides - Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux.
Monographies du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille (1963), 1.

60 - MONTREUIL J., MONSIGNY M. et BUCHET M.T. -
C. R. Acad. Sc. Paris Série D (1967), 264, 2068.

61 - MONTREUIL J. -
In Problèmes actuels de Biochimie Générale, Ed. BOULANGER P., POLONOWSKI P., Masson (1972), 341 p.

62 - MOORE C. et STEIN W.H. -
J. Biol. Chem. (1954), 211, 907.

63 - MOTA I. et JUNCQUEIRA L.C.U. -
Proc. Soc. Exp. Biol. (N-Y), (1953), 83, 455.

64 - MOTA I., BERALDO W.T., FERRI A.G. et JUNCQUEIRA L.C.U. -
Ciba Foundation Symposium Histamine - Little Brown & Co-Boston (1966), p. 47.

65 - MUDD S.H. et MANN J.D. -
J. Biol. Chem. (1963), 238, 2165.

66 - NOMOTO M. et NARAHASHI Y. -
J. Biochem. (Tokyo), (1959), 46, 653.

67 - OUCHTERLONY O. -
Acta Pathol Microbiol. Scand. (1949), 26, 507.

68 - PARROT J.L., URQUIA D.A. et LABORDE C. -
C. R. Soc. Biol. Paris (1951), 145, 885.

69 - PARROT J.L., LEBEL B., COURTOIS J.E., AGNERAY J., DURAND G. et FEGER J. -
C. R. Acad. Sc. Paris Série D (1969), 268, 2536.

70 - PATON W.D.M. -
Brit. J. Pharmacol. (1951), 6, 499.

71 - PAULY R. et LUDWIG E. -
Z. Physiol. Chem. (1922), 121, 170.

72 - PHYLLIS W.J. -
The Pharmacology of the synapsis, Pergamon Press, (1966).

73 - RANG H.P. -
Nature (1971), 231, 91.

74 - RILEY J.F. et WEST G.B. -
J. Physiol. (Lond.), (1952), 117, 72.

75 - RILEY J.F. et WEST G.B. -
J. Physiol. (Lond.), (1953), 120, 528.

76 - RIMINGTON C. -
Biochem. J. (1931), 25, 106.

77 - RIMINGTON C. -
Biochem. J. (1940), 34, 931.

78 - ROCHA E SILVA M. -
J. Pharmacol. Exp. Ther. (1944), 80, 399.

79 - ROCHA E SILVA M. -
Handbook of Experimental Pharmacology. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New-York (1966), 991 p.

80 - RUFF F., SAINDELLE A., DUTRIPON E. et PARROT J.L. -
Nature (1967), 214, 279.

81 - SCHAYER R.W. -
J. Biol. Chem. (1952), 199, 245.

82 - SCHAYER R.W. -
Amer. J. Physiol. (1956), 186, 199.

83 - SCHAYER R.W. -
Amer. J. Physiol. (1957), 189, 533.

84 - SCHAYER R.W. -
In Mechanism of hypersensitivity. Henry Ford International symposium. Little Brown & Co. Boston (1959), 227 p.

85 - SCHAYER R.W. -
Ann. N.Y. Acad. Sci. (1963), 103, 164.

86 - SCHAYER R.W. -
In Progress in Allergy (1963), 7, 187.

87 - SHORE P.A., BURKHALTER A., COHN V.H. -
J. Pharmacol. (1959), 127, 182.

88 - SCHULTZE H.E., HEREMANS J.F. -
Molecular biology of human proteins (1966), 1, 24.
Elsevier Ed., 898 p.

89 - SCHWEIGER R.G. -
Zeitschrift für Polymere (1964), 196, 47.

90 - SLATER G.G. -
Fed. Proc. (1965), 24, 225.

91 - SLATER G.G. -
Anal. Biochem. (1968), 24, 215.

92 - SMITHIES O. -
Biochem. J. (1955), 61, 629.

93 - STONE A.L. -
Biopolymers (1964), 2, 315.

94 - TILLMANS J. et PHILLIPPI K. -
Biochem. Z. (1929), 215, 36.

95 - TRETHEWIE E.R. -
Pharmacology (1968), 1, 195.

96 - ÜVNAS B. -
Ann. N.Y. Acad. Sci. (1964), 116, 880.

97 - VON EULER U.S., ROSELL S. et ÜVNAS B. -
Mechanism of release of biogenic amines, Pergamon Press (1966).

98 - WARREN L. -
Fed. Proc. (1959), 18, 847.

99 - WERLE E. -
Biochem. Z. (1936), 288, 292.

Paris, le 20 Juin 1972.

Vu et permis d'imprimer

Le Vice-Président de l'Université

Paris-XI,

Y. Cohen.